



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Química Orgánica

**DISEÑO Y SÍNTESIS DE SOPORTES POLIMÉRICOS POROSOS  
PARA LA OBTENCIÓN DE NUEVOS BIOCATALIZADORES Y  
SU APLICACIÓN EN PROCESOS DE QUÍMICA SOSTENIBLE**

**ANTONIO AIRES TRAPOTE**

Memoria presentada para optar al grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS

Directores:

Dr. Ángel Rumbero Sánchez

Dra. M<sup>a</sup> José Hernaiz Gómez-Dégano

Universidad Autónoma de Madrid

Madrid, 2012



Quisiera expresar mi agradecimiento al Dr. Ángel Rumbero Sánchez y a la Dra. María José Hernaiz Gómez-Dégano por llevar a cabo la dirección de este trabajo, así como la confianza depositada en mí para realizarlo.

Al Dr. Juan Rubio Alonso del Instituto de Cerámica y vidrio del CSIC por su tiempo, ayuda, correcciones y enseñanzas.

Al Dr. José Vicente Sinisterra Gago y al Dr. Andrés Alcantara León del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Universidad Complutense de Madrid, por sus enseñanzas, así como la ayuda prestada durante estos años de aprendizaje.

Al Dr. Santiago Luis Vicente y al Dr. Eduardo García-Verdugo Cepeda del Departamento de Química Inorgánica y Orgánica de la Universidad Jaume I de Castellón, por sus enseñanzas y apoyo durante los cursos de doctorado.

Al Dr. Donald Hilvert del Departamento de Química Orgánica del Instituto Federal Suizo de Tecnología de Zúrich (ETH), por permitirme realizar una estancia predoctoral en su excelente grupo.

A la Dra. Pilar Hoyos Vidal del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Universidad Complutense de Madrid, ayuda, consejos y por su amistad.

Al Dr. Jorge-Abel Trelles de la Universidad Nacional de Quilmes por su ayuda, sugerencias, consejos, y sobre todo por su amistad.

A María Jesús Sánchez García del Instituto de Cerámica y vidrio del CSIC por su inestimable ayuda con las adsorciones de nitrógeno.

A todos mis compañeros de laboratorio del Departamento de Química Orgánica, Iñigo, Mario, etc., y en especial a David y Muñiz, por todo el tiempo, consejos, charlas, chistes, risas, amistad y demás que hemos compartido durante los últimos años.

A mis compañeros de la Universidad Complutense de Madrid, Carlos, Manuel, David, etc., por su amistad y compañía.

A mis compañeros de fatigas de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid, Luís, Santi, Suso, Diego, Juanillo, María, Mara, Zuma, David, Pablete, etc., que me han animado y apoyado durante muchos años.

A mis amigos de siempre, en especial a Miguel, Abuelo, Paul, Lucas y Riki, que han estado ahí incondicionalmente para lo que necesitara.

A “Er Yube”, mi grandísimo compañero de cordada y aventuras en la montaña durante tantos años.

A mi hermana Lydia, Raúl (cuñado) y Julián (sobrino), por su apoyo, cariño y amor.

A mi alma gemela, Meri, por su apoyo, cariño y amor, por hacerme sentir tan completo y por compartir su vida conmigo.

Quería dejar para el final mi más profundo y sentido agradecimiento a mis padres, por su confianza, apoyo, paciencia, comprensión, amistad, cariño y amor.

*A mis padres*



---

---

# *Índice*

---

---





# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.</b>	<b>1</b>
1.1. Soportes poliméricos y su aplicación en biocatálisis.	3
1.1.1. Generalidades.	3
1.1.2. Clasificación de los polímeros	4
1.1.3. Técnicas de polimerización.	6
1.1.4. Aplicaciones de los soportes poliméricos en biocatálisis.	8
1.2. Biocatálisis.	9
1.2.1. Principales tipos de enzimas utilizadas en biocatálisis; hidrolasas.	10
1.2.1.1. Lipasas.	11
1.2.1.2. Glicosidasas.	13
1.2.1.3. Aplicaciones de las lipasas en química orgánica.	15
1.2.1.3.1. Resoluciones cinéticas y cinéticas dinámicas de alcoholes secundarios.	17
1.2.1.3.2. Resoluciones cinéticas y cinéticas dinámicas de compuestos $\alpha$ -hidroxicarbonílicos.	26
1.2.1.4. Aplicaciones de las glicosidasas en química orgánica.	29
1.2.1.4.1. Síntesis enzimática de oligosacáridos con glicosidasas.	29
1.2.1.4.2. Síntesis enzimática de oligosacáridos con galactosidasas.	30
1.2.2. Inmovilización de enzimas.	31
1.2.2.1. Métodos de inmovilización de enzimas.	33
1.2.2.2. Soportes para la inmovilización de enzimas.	35
1.2.2.3. Aplicaciones de las enzimas inmovilizadas.	36
1.3. Química sostenible.	38
1.3.1. Los doce principios de la química sostenible.	39
1.3.2. Disolventes sostenibles.	40
1.3.3. Disolventes sostenibles y su aplicación en biocatálisis.	40
<b>2. ANTECEDENTES.</b>	<b>47</b>
2.1. Síntesis de soportes poliméricos para la inmovilización de enzimas.	49
2.2. Inmovilización-estabilización covalente de enzimas sobre soportes poliméricos funcionalizados con grupos epóxido.	49
2.3. Inmovilización de diferentes enzimas y sus aplicaciones.	50
<b>3. OBJETIVOS.</b>	<b>53</b>

<b>4. PLAN DE TRABAJO.</b>	<b>57</b>
4.1. Preparación de soportes poliméricos porosos.	59
4.2. Caracterización de los soportes poliméricos.	63
4.3. Obtención de biocatalizadores: inmovilización-estabilización de enzimas.	63
4.4. Aplicaciones de los biocatalizadores.	64
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</b>	<b>67</b>
5.1. Síntesis y caracterización de monómeros.	69
5.1.1. Síntesis y caracterización de monómeros alquilo-xiranos.	69
5.1.2. Síntesis y caracterización de monómeros metacriloxiranos.	71
5.1.3. Síntesis y caracterización de monómeros ariloxiranos.	74
5.2. Síntesis y caracterización de agente de entrecruzamiento.	77
5.3. Síntesis, superficie específica y porosidad de los soportes poliméricos.	78
5.3.1. Síntesis, superficie específica y porosidad de polímeros de alquilo-xiranos con agente de entrecruzamiento arílico.	80
5.3.2. Síntesis, superficie específica y porosidad de polímeros de alquilo-xiranos con mezcla de agentes de entrecruzamiento alquílico y arílico.	99
5.3.3. Síntesis, superficie específica y porosidad de polímeros de metacriloxirano con agente de entrecruzamiento metacrílico.	115
5.3.4. Síntesis, superficie específica y porosidad de polímeros de ariloxiranos con agente de entrecruzamiento arílico.	177
5.4. Inmovilización-estabilización de enzimas.	195
5.4.1. Inmovilización-estabilización de glicosidasas.	195
5.4.1.1. Inmovilización-estabilización de $\beta$ -galactosidasa de <i>Bacillus circulans</i> (Biolacta).	195
5.4.1.2. Inmovilización-estabilización de $\beta$ -galactosidasa de <i>Escherichia coli</i> .	199
5.4.1.3. Inmovilización-estabilización de $\beta$ -galactosidasa recombinante de <i>Bacillus circulans</i> $\beta$ -gal-3 ATCC 31382.	201
5.4.1.4. Inmovilización-estabilización de $\beta$ -galactosidasa de <i>Thermus thermophilus</i> TTP0042.	204
5.4.2. Inmovilización-estabilización de lipasas.	207
5.4.2.1. Inmovilización-estabilización de lipasa de <i>Pseudomonas fluorescens</i> .	208
5.4.2.2. Inmovilización-estabilización de lipasa de <i>Pseudomonas cepacia</i> .	212
5.4.2.3. Inmovilización-estabilización de lipasa de <i>Pseudomonas stutzeri</i> .	218
5.5. Aplicaciones de los biocatalizadores.	224

5.5.1. Aplicaciones de glicosidasas.	224
5.5.1.1. Síntesis enzimática de <i>N</i> -acetil-lactosamina ( <b>27</b> ) con $\beta$ -galactosidasa de <i>Bacillus circulans</i> (Biolacta).	224
5.5.2. Aplicaciones de lipasas.	233
5.5.2.1. Resoluciones cinéticas de alcoholes secundarios.	233
5.5.2.1.1. Resolución cinética de ( <i>R, S</i> )-1-fenil-1-etanol ( <b>29</b> ).	234
5.5.2.1.2. Resolución cinética de ( <i>R, S</i> )-1-fenil-1-propanol ( <b>32</b> ).	252
5.5.2.1.3. Resolución cinética de ( <i>R, S</i> )-1-fenil-2-propanol ( <b>35</b> ).	256
5.5.2.1.4. Resolución cinética de ( <i>R, S</i> )-1-fenil-2-pentanol ( <b>38</b> ).	261
5.5.2.1.5. Resolución cinética de ( <i>R, S</i> )-1-(naftil) etanol ( <b>41</b> ).	266
5.5.2.1.6. Resolución cinética de ( <i>R, S</i> )-1,2-diaril-2-hidroxicetonas.	270
5.5.2.2. Resoluciones cinéticas dinámicas.	280
5.5.2.2.1. Resolución cinética dinámica de ( <i>R, S</i> )-1-fenil-1-etanol ( <b>29</b> ).	281
5.5.2.2.2. Resolución cinética dinámica de ( <i>R, S</i> )-1,2-difenil-2-hidroxietanona ( <b>44</b> ).	286
5.5.3. Aplicaciones industriales de los biocatalizadores.	289
5.5.3.1. Resolución cinética dinámica de ( <i>R, S</i> )-1,2-difenil-2-hidroxietanona ( <b>44</b> ).	289
<b>6. PARTE ESPERIMENTAL.</b>	<b>293</b>
6.1. Materiales y métodos.	295
6.2. Procedimiento de síntesis de productos.	299
6.2.1. Síntesis de monómeros.	299
6.2.1.1. Síntesis de monómeros alquioxiranos.	299
6.2.1.2. Síntesis de monómeros metacriloalquioxiranos.	302
6.2.1.3. Síntesis de monómeros ariloxiranos.	305
6.2.2. Síntesis de agente de entrecruzamiento.	309
6.2.3. Síntesis de soportes poliméricos.	310
6.2.3.1. Síntesis de polímeros de alquioxiranos con agente de entrecruzamiento arílico.	310
6.2.3.2. Síntesis de polímeros de alquioxiranos con mezcla de agentes de entrecruzamiento alquílico y arílico.	313
6.2.3.3. Síntesis de polímeros de metacriloalquioxiranos con agente de entrecruzamiento metacrílico.	316
6.2.3.4. Síntesis de polímeros de ariloxiranos con agente de Entrecruzamiento arílico.	323
6.3. Inmovilización-estabilización de enzimas.	325
6.3.1. Inmovilización-estabilización de glicosidasas.	325

6.3.1.1. Inmovilización-estabilización de $\beta$ -galactosidasa de <i>Bacillus circulans</i> .	325
6.3.1.2. Inmovilización-estabilización de $\beta$ -galactosidasa de <i>Escherichia coli</i> .	331
6.3.1.3. Inmovilización-estabilización de $\beta$ -galactosidasa recombinante de <i>Bacillus circulans</i> $\beta$ -gal-3 ATCC 31382.	332
6.3.1.4. Inmovilización-estabilización de $\beta$ -galactosidasa de <i>Thermus thermophilus</i> TTP0042.	332
6.3.2. Inmovilización-estabilización de lipasas.	334
6.3.2.1. Inmovilización-estabilización de lipasa de <i>Pseudomonas fluorescens</i> .	334
6.3.2.2. Inmovilización-estabilización de lipasa de <i>Pseudomonas cepacia</i> .	336
6.3.2.3. Inmovilización-estabilización de lipasa de <i>Pseudomonas stutzeri</i> .	338
6.4. Aplicaciones de los biocatalizadores.	340
6.4.1. Aplicaciones de glicosidasas.	340
6.4.1.1. Síntesis enzimática de <i>N</i> -acetil-lactosamina (27) con $\beta$ -galactosidasa de <i>Bacillus circulans</i> .	340
6.4.2. Aplicaciones de lipasas.	344
6.4.2.1. Resoluciones cinéticas de alcoholes secundarios.	344
6.4.2.1.1. Resolución cinética de ( <i>R, S</i> )-1-fenil-1-etanol (29).	344
6.4.2.1.2. Resolución cinética de ( <i>R, S</i> )-1-fenil-1-propanol (32).	349
6.4.2.1.3. Resolución cinética de ( <i>R, S</i> )-1-fenil-2-propanol (35).	351
6.4.2.1.4. Resolución cinética de ( <i>R, S</i> )-1-fenil-2-pentanol (38).	353
6.4.2.1.5. Resolución cinética de ( <i>R, S</i> )-1-(naftil) etanol (41).	355
6.4.2.1.6. Resolución cinética de ( <i>R, S</i> )-1,2-diaril-2-hidroxicetonas.	357
6.4.2.2. Resoluciones cinéticas dinámicas.	368
6.4.2.2.1. Resolución cinética dinámica de ( <i>R, S</i> )-1-fenil-1-etanol (29).	368
6.4.2.2.2. Resolución cinética dinámica de ( <i>R, S</i> )-1,2-difenil-2-hidroxietanona (44).	370
6.5. Aplicaciones industriales de los biocatalizadores.	370
6.5.1. Resolución cinética dinámica de ( <i>R, S</i> )-1,2-difenil-2-hidroxietanona (44).	370
<b>7. CONCLUSIONES.</b>	<b>373</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA.</b>	<b>379</b>

# Capítulo I

## *Introducción*



# 1. INTRODUCCIÓN

La química ha sido una fuente de bienestar y comodidad para el ser humano, como lo demuestra el origen de diversos productos que usamos a diario. Pero la industria química, que durante mucho tiempo ha sido considerada proveedora de confort y de innovaciones, ha recorrido un largo y complejo camino hasta ser considerada, hoy día, como una de las principales responsables de ensuciar el planeta. De hecho, es la industria que libera mayor cantidad y variedad de sustancias tóxicas al medio ambiente.

Las presiones medioambientales, desde distintos foros en la última década, han hecho que la empresa química participe activamente en la búsqueda de soluciones para los problemas ambientales. Soluciones que van desde el tratamiento de residuos tóxicos y contaminantes, en este caso la solución se sitúa después del proceso de producción, hasta la solución preventiva, cuyo objetivo es introducir en el proceso de producción las modificaciones necesarias para minimizar, o eliminar si es posible, tanto la generación de residuos como la utilización de sustancias tóxicas.

En el camino, hacia metodologías más sostenibles para la manufactura de compuestos químicos, <sup>1</sup> la biocatálisis <sup>2</sup> ha ganado una gran popularidad en los últimos años y, hoy día, su potencial de aplicaciones está totalmente reconocido. Gracias a los últimos avances en biotecnología, se ha abierto un amplio abanico de aplicaciones de la biocatálisis en la síntesis orgánica industrial. <sup>3</sup> Sin embargo, el uso de enzimas solubles como biocatalizadores, presenta serios inconvenientes tales como: la estabilidad de la enzima bajo las condiciones de reacción y la imposibilidad de una múltiple reutilización de la enzima en procesos industriales. Por ello, se impone un estudio sobre la inmovilización-estabilización de las enzimas que revierta en: a) una reducción en la cantidad de enzima a utilizar, b) la prolongación de la vida media de las enzimas en los reactores y c) un incremento en la reutilización de la enzima en ciclos industriales. Conseguir esto, supondrá incrementar el número de aplicaciones prácticas de la catálisis enzimática, haciéndolas más operativas a nivel industrial.

## 1.1. Soportes poliméricos y su aplicación en biocatálisis

### 1.1.1. Generalidades

El término polímero deriva de las palabras griegas *poly* y *mero*, que significan *mucho* y *parte ó segmento*, respectivamente. De esta forma, podemos definir un polímero como aquella macromolécula de elevado peso molecular formada a partir de numerosas unidades estructurales de repetición, llamadas monómeros, unidas entre sí mediante enlaces covalentes.

La constitución de los polímeros, formados por unidades químicas de muy diversa naturaleza y conectadas entre sí formando estructuras macromoleculares simples o complejas, da lugar a una infinidad de variaciones en su estructura química y es por lo tanto, lo que permite la preparación de materiales con una amplia gama de propiedades físicas, químicas y mecánicas. El estudio

analítico de la síntesis y propiedades de nuevos y sofisticados materiales está en pleno auge, aunque los polímeros convencionales continúan siendo objeto de investigaciones muy concretas dirigidas fundamentalmente a la mejora de sus propiedades, así como a modificaciones que permitan la ampliación de su campo de aplicaciones.

Las propiedades de los materiales polímeros dependen fundamentalmente de su estructura química, peso molecular y conformación macromolecular. Es evidente que cuando se busca una determinada propiedad, lo esencial en primer lugar es seleccionar adecuadamente la estructura química, y de acuerdo con los conocimientos químico-orgánicos diseñar la síntesis que logre el objetivo deseado.

### 1.1.2. Clasificación de los polímeros

Debido a la gran variedad de materiales poliméricos existentes, es necesario agruparlos según sus características, facilitando así el entendimiento y el estudio de sus propiedades. Con este objetivo se pueden clasificar de varias maneras, de acuerdo con su origen, su composición química, su mecanismo de polimerización, los tipos de estructuras químicas, el comportamiento frente al calor, el comportamiento mecánico, u otras características.

- **Clasificación según su origen**

- **Polímeros naturales.** Existen en la naturaleza muchos polímeros y las biomoléculas que forman los seres vivos son macromoléculas poliméricas. Por ejemplo, las proteínas, los ácidos nucleicos, los polisacáridos, el caucho, la lignina, etc.

- **Polímeros semisintéticos.** Se obtienen por transformación de polímeros naturales. Por ejemplo, la nitrocelulosa, el caucho vulcanizado, etc.

- **Polímeros sintéticos.** Muchos polímeros se obtienen industrialmente a partir de los monómeros. Por ejemplo, el nylon, el poliestireno, el Policloruro de vinilo, el polietileno, etc.

- **Clasificación según su composición química**

- **Polímeros orgánicos.** Poseen en la cadena principal átomos de carbono.

- **Polímeros inorgánicos.** Poseen en la cadena principal átomos diferentes al carbono. Por ejemplo, polisulfuros (basados en azufre) y siliconas (basados en silicio).

- **Clasificación según el mecanismo de polimerización**

En 1929 Carothers propuso la siguiente clasificación: <sup>4</sup>

- **Polímeros de condensación.** La reacción de polimerización implica a cada paso la formación de una molécula de baja masa molecular, por ejemplo, el desprendimiento de una molécula de agua en la formación de poliéster a partir de un ácido dicarboxílico y un diol.

- **Polímeros de adición.** La polimerización no implica la liberación de ningún compuesto de baja masa molecular. Esta polimerización se genera cuando un "catalizador", inicia la reacción. Este catalizador separa la unión doble carbono en los monómeros, luego aquellos monómeros se unen con otros debido a los electrones libres, y así se van uniendo uno tras uno hasta que la reacción termina.



Años más tarde, en 1953, Flory generalizó y perfeccionó esta clasificación utilizando como criterio el mecanismo de reacción, dividiendo las reacciones en polimerizaciones en cadena y en etapas, que corresponden, respectivamente, a las poliadiciones y policondensaciones.<sup>5</sup>

- **Clasificación de Flory** (modificación a la de Carothers para considerar la cinética de la reacción):

- **Polímeros formados por reacción en cadena.** Se requiere un iniciador para comenzar la polimerización; un ejemplo es la polimerización de alquenos (de tipo radicalario). En este caso el iniciador reacciona con una molécula de monómero, dando lugar a un radical libre, que reacciona con otro monómero y así sucesivamente. La concentración de monómero disminuye lentamente. Además de la polimerización de alquenos, incluye también polimerización donde las cadenas reactivas son iones (polimerización catiónica y aniónica).

- **Polímeros formados por reacción por etapas.** El peso molecular del polímero crece a lo largo del tiempo de manera lenta, por etapas. Ello es debido a que el monómero desaparece rápidamente, pero no da inmediatamente un polímero de peso molecular elevado, sino una distribución entre dímeros, trímeros, y en general, oligómeros; transcurrido un cierto tiempo, estos oligómeros empiezan a reaccionar entre sí, dando lugar a especies de tipo polimérico. Esta categoría incluye todos los polímeros de condensación de Carothers y además algunos otros que no liberan moléculas pequeñas pero sí se forman gradualmente, como por ejemplo los poliuretanos.

- **Clasificación según el tipo de estructura química**

Atendiendo al tipo de estructura química, los polímeros se pueden agrupar en tres divisiones:

#### 1. Según la cantidad de monómeros diferentes en el polímero

- **Homopolímero.** Polímero constituido por un tipo de unidad estructural repetida. Por ejemplo, polietileno y poliacrilonitrilo.

- **Copolímero.** Polímero constituido por dos o más monómeros diferentes. Por ejemplo, SAN (compuesto por estireno y acrilonitrilo) y NBR (compuesto por acrilonitrilo y butadieno). Dentro de los polímeros podemos diferenciar:

- *Copolímeros al azar*, en los que los monómeros poseen una secuencia desordenada a lo largo de la cadena.

- *Copolímeros alternados*, en los que los monómeros se suceden alternadamente.

- *Copolímeros en bloques*, en los que los monómeros aparecen agrupados en tramos.

- *Copolímeros de injerto*, en los que la cadena principal que constituye el polímero está compuesta por un monómero y las ramificaciones laterales están formadas por el otro monómero.

## 2. Según la estructura química de los monómeros

Esta clasificación se basa en los grupos funcionales presentes en el monómero y podemos diferenciar: poliolefinas, poliésteres, poliamidas, etc.

## 3. Según la forma de la cadena polimérica

- **Polímeros lineales**, son polímeros que no presentan ramificaciones.
- **Polímeros ramificados**, son polímeros que presentan cadenas laterales.
- **Polímeros entrecruzados**, son polímeros que poseen estructura tridimensional, donde las cadenas poliméricas están unidas unas a otras por enlaces químicos.

- **Clasificación según su comportamiento mecánico**

- **Plásticos** (del griego: adecuado al modelado, moldeo), son materiales poliméricos estables en las condiciones normales de uso, pero que durante alguna etapa de su fabricación estuvieron fluidos. Esta propiedad les permite ser moldeados por calentamiento, por presión o por ambos. Por ejemplo, polietileno, polipropileno, poliestireno.
- **Elastómeros** (cauchos), son materiales poliméricos que pueden ser tanto de origen natural como sintética. Después de sufrir una deformación bajo la acción de una fuerza, recuperan la forma original rápidamente, por más que la deformación haya sido grande o aplicada por bastante tiempo. Por ejemplo, polibutadieno, caucho nitrílico, poli(estireno-*co*-butadieno).
- **Fibras**, poseen una relación muy elevada entre la longitud y el diámetro. Generalmente son constituidas de macromoléculas lineales y se mantienen orientadas longitudinalmente. Por ejemplo, poliésteres, poliamidas y poliacrilonitrilo.

### 1.1.3. Técnicas de polimerización

Existen cuatro técnicas industriales empleadas en la polimerización de un monómero, la polimerización en masa, en solución, en suspensión y en emulsión. Cada una de estas técnicas tiene condiciones específicas y dan origen a polímeros con características diferentes.

- **Polimerización en Masa (Bulk polymerization)**

La polimerización en Masa <sup>6-13</sup> es una técnica simple, homogénea, donde solo el monómero y el iniciador están presentes en el sistema. Puede ser iniciada térmicamente o por radiación. Por consiguiente, esta técnica es económica, además de producir polímeros con un alto grado de pureza. Esta polimerización es altamente exotérmica, ocurriendo dificultades en el control de la temperatura y agitación del medio de reacción, que rápidamente se vuelve viscoso desde el inicio de la polimerización. La agitación durante la polimerización debe ser vigorosa para que haya dispersión del calor en la formación del polímero, evitándose puntos de sobrecalentamiento, que dan un color amarillento al producto. Este inconveniente puede ser evitado usándose inicialmente un pre-polímero (mezcla de polímero y monómero), que es producido a una temperatura más baja, con una baja conversión y condiciones moderadas. Camino del molde, se calienta el pre-polímero completándose la polimerización.

La polimerización en masa es muy usada en la fabricación de lentes plásticas amorfas, debido a las excelentes cualidades ópticas conseguidas en las piezas moldeadas, sin presión, como en el caso del poli(metacrilato de metilo).

- **Polimerización en disolución (In-situ polymerization)**

En la polimerización en disolución,<sup>14-17</sup> además del monómero y del iniciador, se emplea un disolvente, que debe disolverlos, formando un sistema homogéneo. El disolvente ideal debe ser barato, de bajo punto de ebullición y de fácil separación del polímero resultante. Al final de esta polimerización, el polímero formado puede ser soluble o no en el disolvente usado. En el caso de que el polímero sea insoluble, se obtiene un lodo, fácilmente separado del medio de reacción por filtración. Si el polímero fuese soluble, se utiliza un codisolvente para precipitarlo en forma de fibras o polvo.

La polimerización en solución tiene como ventaja la temperatura homogénea debido a la fácil agitación del sistema, que evita el problema del sobrecalentamiento.

Esta es la técnica que ha sido empleada en esta Memoria de Tesis para llevar a cabo la síntesis de los diferentes grupos de polímeros. En concreto, los polímeros obtenidos en esta memoria han sido sintetizados por polimerización radicalaria en disolución empleando un disolvente porogénico (ciclohexanol).

- **Polimerización en Emulsión (Emulsion polymerization)**

La polimerización en emulsión,<sup>18-21</sup> es una polimerización heterogénea en medio líquido, que requiere una serie de aditivos con funciones específicas, como emulgentes (generalmente un detergente), tampones de pH, protectores, reguladores de tensión superficial, reguladores de polimerización (modificadores) y activadores (agentes de reducción). En esta polimerización, el iniciador es soluble en agua, mientras que el monómero es apenas parcialmente soluble. El emulgente tiene como objetivo formar micelas, de tamaño entre 1-10<sup>6</sup> nm, donde el monómero queda contenido. Algunas micelas son activas, o sea, la reacción de polimerización se procesa dentro de ellas, mientras que otras son inactivas (gotas de monómeros), constituyendo apenas una fuente de monómero. A medida que la reacción ocurre, las micelas inactivas suplen a las activas con monómero, que crecen hasta formar gotas de polímero, originando posteriormente el polímero sólido.

La polimerización en emulsión tiene una alta velocidad de reacción y conversión, siendo de fácil control de agitación y temperatura. Los polímeros obtenidos con esta técnica presentan altos pesos moleculares, pero son de difícil purificación por la cantidad de aditivos adicionados. Sin embargo, esta técnica tiene gran importancia industrial y es muy empleada en poliadiciones, principalmente, cuando se aplica directamente el látex resultante.

- **Polimerización en Suspensión (Suspension polymerization)**

La polimerización en suspensión<sup>22-25</sup> (mezcla en que pequeñas partículas de un sólido o líquido se mantienen suspendidas en un líquido o un gas), también conocida como

polimerización en perlas, por la forma como se obtienen los polímeros, es una polimerización heterogénea donde el monómero y el iniciador son insolubles en el medio dispersante, en general el agua. En la polimerización en suspensión en fase acuosa mediante agitación se mantiene el monómero (insoluble en agua) en forma de gotas en las que tiene lugar la reacción.

Esta modalidad se distingue de la aparentemente similar polimerización en emulsión por la localización del iniciador y la cinética a que obedece. El iniciador está disuelto en el monómero y la cinética es la misma que la de la polimerización en masa. El monómero es la fase dispersa y da lugar a un polímero en fase sólida también dispersa. La dispersión se mantiene por una combinación de agitación y el empleo de estabilizadores solubles en agua (por ejemplo, metilcelulosa o gelatina). La polimerización tiene lugar dentro de las partículas en suspensión, las cuales tienen tamaño medio de 2-10 mm, donde se encuentran el monómero y el iniciador. La agitación del sistema es un factor muy importante en esta técnica, pues según la velocidad de agitación empleada, varía el tamaño de las partículas. Además del monómero el iniciador y el solvente, también se adicionan agentes tensoactivos (Sustancia, como un detergente, que al adicionarla a un líquido aumenta la capacidad de este desparramarse y humedecer, debido a la disminución de su tensión superficial), que auxilian en la suspensión del polímero formado, evitando la adhesión entre las partículas y, como consecuencia, la precipitación del polímero sin la formación de las perlas. La precipitación del polímero también puede ser evitada por la adición al medio reaccionante de un polímero hidrosoluble, de elevado peso molecular, que aumente la viscosidad del medio. No obstante, la incorporación de estos aditivos al sistema dificulta la purificación del polímero resultante.

#### **1.1.4. Aplicaciones de los soportes poliméricos en biocatálisis.**

Las principales aplicaciones de los soportes poliméricos en biocatálisis son:

1. Inmovilización de enzimas y células empleadas en procesos biocatalíticos.
2. Purificación de enzimas empleadas en procesos biocatalíticos.
3. Soportes para procesos biocatalíticos tanto en fase sólida como en fase líquida.

##### **1.1.4.1. Inmovilización de enzimas y células empleadas en procesos biocatalíticos.**

La implementación de un biocatalizador en un proceso industrial requiere una previa optimización de sus propiedades. Para ello es necesario la utilización de un biocatalizador altamente estable y que pueda ser recuperado del medio y reutilizado. Una de las técnicas más antiguas que permite mejorar estas propiedades, además de elaborar un derivado fácilmente manejable y reutilizable, es la inmovilización del biocatalizador.<sup>26-35</sup> El aumento de la estabilidad y el hecho de que las enzimas puedan ser reutilizadas, hacen que aumente considerablemente la productividad del catalizador, lo que se refleja en un proceso mucho más económico. Además, supone una contribución directa en el desarrollo de procesos industriales más sostenibles.

En esta memoria de tesis, la inmovilización de enzimas ha sido la aplicación desarrollada con los soportes poliméricos sintetizados, y más adelante se desarrollará este tema en profundidad.

#### **1.1.4.2. Purificación de enzimas empleadas en procesos biocatalíticos.**

La producción de una enzima por los métodos de la biotecnología clásica incluye dos etapas principales: la de fermentación, en la que se multiplica el microorganismo productor de la enzima, y la de recuperación y purificación, en la que se aísla la enzima y se lleva al grado de pureza adecuado para su uso.

Se han desarrollado numerosos métodos y técnicas que permiten el aislamiento y la purificación de enzimas. Entre estos métodos, destacan los métodos por precipitación, los métodos cromatográficos y los métodos electroforéticos. En muchos de estos métodos de purificación, es imprescindible el empleo de diversos polímeros.

En los últimos 20 años, el empleo de polímeros en la purificación de enzimas ha sido intensamente investigada por numerosos grupos de investigación.<sup>36-47</sup>

#### **1.1.4.3. Procesos biocatalíticos en fase sólida y fase líquida.**

Los polímeros han sido ampliamente utilizados como soportes en la síntesis en fase sólida<sup>48-50</sup> y en fase líquida,<sup>51, 52</sup> tanto química como enzimática, de oligopéptidos,<sup>53</sup> oligosacáridos,<sup>54,55</sup> glicoconjugados (glicopéptidos,<sup>56,57</sup> glicoesfingolípidos,<sup>58</sup> etc.), oligonucleótidos,<sup>59-61</sup> ácidos nucleicos<sup>62</sup> y otros compuestos,<sup>63</sup> para solucionar los problemas que se originan en estas síntesis selectivas con múltiples pasos, incluyendo pasos de protección-desprotección y la purificación cromatográfica de los productos intermedios en cada etapa de síntesis.

### **1.2. Biocatálisis**

Hoy en día se sabe que en los organismos vivos existe una diversidad de moléculas que juegan el rol de catalizadores. Estas moléculas reciben el nombre de *enzimas*. Este término fue acuñado por Kühne en 1878 para designar a los extractos de levadura con actividad catalítica. La extensa mayoría de las enzimas son proteínas, aunque también existen moléculas de ácido ribonucleico que poseen actividad catalítica. Estas moléculas de origen biológico con actividad catalítica, aplicadas a alguna reacción sobre algún compuesto en particular, reciben comúnmente el nombre de *biocatalizadores*. Análogamente, se puede definir a la *biocatálisis* como la disciplina que involucra el uso de biocatalizadores en la transformación química de la materia. El compuesto que sufre la transformación en estas condiciones se llama *sustrato*. Es importante señalar que los sustratos empleados en una reacción biocatalítica no son necesariamente aquellos que son transformados por la enzima en las reacciones que forman parte del metabolismo del organismo del cual proviene la misma. Las enzimas utilizadas en biocatálisis pueden emplearse tanto integradas en el organismo vivo (o sea, usar células enteras o tejidos como biocatalizadores), como aisladas de los mismos con mayor o menor grado de

pureza. También existe otro término asociado al uso de biocatalizadores que se conoce como *biotransformación*. Una biotransformación puede definirse como cualquier proceso en el cual un organismo vivo modifica un compuesto químico. Esta expresión tiene una aplicación que excede a la biocatálisis, ya que es empleada con el mismo significado en el campo de la toxicología, farmacología y biorremediaciones. No obstante, es necesario aclarar que ambos términos: biocatálisis y biotransformación, no tienen acepción equivalente al referirse al empleo de biocatalizadores con fines de síntesis de algún compuesto de interés, ya que las biotransformaciones no involucran el uso de enzimas aisladas.

### 1.2.1. Principales enzimas utilizadas en biocatálisis: hidrolasas.

Las enzimas utilizadas como catalizadores de reacciones orgánicas se pueden dividir en seis grupos: <sup>64</sup> oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas. La mayoría de los procesos biocatalíticos se desarrollan con la utilización de hidrolasas (60 %), seguido de oxidorreductasas (25 %); los otros 4 grupos de enzimas constituyen el 15 % restante, pero van adquiriendo cada vez mayor importancia, como ocurre con las liasas, formadoras de enlace C-C.<sup>65-67</sup>

La utilización de biocatalizadores en síntesis orgánica presenta una serie de ventajas <sup>68, 69</sup> resumidas a continuación:

- Son catalizadores eficientes, que actúan en rangos de temperatura moderada (20-40 °C) y presión atmosférica, minimizando problemas de epimerización, racemización e isomerización que puedan ocurrir.
- Presentan una elevada selectividad: regio-, quimio- y enantioselectividad.
- Su actividad no queda restringida a sus sustratos naturales, sino que admiten una amplia variedad de sustratos.
- Pueden catalizar un amplio abanico de reacciones, incluso llevar a cabo reacciones que químicamente no se podría, sobre grupos no activados del sustrato.
- Muchos de ellas, principalmente las hidrolasas, presentan actividad catalítica en medios orgánicos, lo que permite la transformación de sustratos hidrofóbicos.
- Los biocatalizadores pueden ser inmovilizados, lo que aumenta su actividad en determinados casos, y permite su reutilización en diferentes ciclos.
- Los biocatalizadores son biodegradables.
- Las enzimas pueden ser sobre expresadas, haciendo los procesos biotecnológicos económicamente eficientes. Además, mediante las innovadoras técnicas de ingeniería genética es posible manipular enzimas, de forma que se modifique su especificidad de sustrato, actividad, estabilidad, etc.
- Las reacciones biocatalizadas son altamente compatibles con el medio ambiente, cumpliéndose los principios de la Química Sostenible, <sup>70</sup> por lo que contribuyen al desarrollo de procesos ambientalmente benignos para la obtención de productos de alto

valor añadido. La sostenibilidad de un proceso incluye la energía y materia prima utilizadas, las pérdidas de rendimiento con productos secundarios, la seguridad del proceso y la calidad del producto. Ya existen numerosos procesos biocatalíticos establecidos en la industria, que han proporcionado una mejora de estos aspectos, lo que implica también una mejora económica del proceso y mayor competitividad.<sup>71, 72</sup>

Frente a estas ventajas, la utilización de enzimas o células enteras también presenta limitaciones:

- Muchos biocatalizadores presentan actividad en un intervalo estrecho de pH y temperatura, pudiendo desactivarse fácilmente fuera de esos límites.
- La gran mayoría son susceptibles de sufrir inhibición por sustrato o por producto.
- Su actividad natural se lleva a cabo en medios acuosos, por lo que algunos pueden ser desactivados en medios orgánicos.

Existen diferentes técnicas para superar estas limitaciones y aumentar la eficacia de los biocatalizadores como la alteración del medio de reacción (ingeniería del medio)<sup>73, 74</sup> o la inmovilización del catalizador.<sup>75</sup> En los últimos años, gracias a los avances en biología molecular, ingeniería genética y bioinformática, se están desarrollando técnicas tales como procesos de evolución dirigida, mediante los que se consiguen biocatalizadores más específicos, aumentando su actividad, su resistencia y su enantioselectividad, que incluso puede ser cambiada.<sup>76-82</sup> Todo esto hará que en un futuro se incremente enormemente la implementación de procesos biocatalíticos en la industria.

De todas las enzimas empleadas como catalizadores en reacciones de química orgánica, son las lipasas las más utilizadas a nivel industrial y uno de los tipos de enzimas empleadas en esta Memoria.

#### **1.2.1.1 Lipasas**

Las lipasas (EC 3.1.1.3) son enzimas pertenecientes al grupo de hidrolasas, que catalizan la hidrólisis de ésteres formados a partir de glicerol y ácidos grasos de cadena larga, de una forma regioselectiva y enantioselectiva. Dada su estabilidad en medios orgánicos, el hecho de que no requieran cofactores, su elevada regio-, quimio- y enantioselectividad y el amplio espectro de sustratos que pueden transformar,<sup>83, 84</sup> son en muchas ocasiones el biocatalizador de elección en la preparación de moléculas orgánicas quirales. Son las enzimas que mayoritariamente se emplean en procesos de resolución cinética de mezclas racémicas de alcoholes, ácidos, ésteres y aminas. Se utilizan preferentemente en la resolución de alcoholes secundarios,<sup>85</sup> mediante procesos de hidrólisis de los correspondientes ésteres o procesos de transesterificación, por la elevada enantioselectividad que presentan frente a este tipo de sustratos. Se podría resumir que la enantioselectividad del proceso dependerá del origen de la lipasa, la estructura del sustrato y las condiciones experimentales de la reacción.

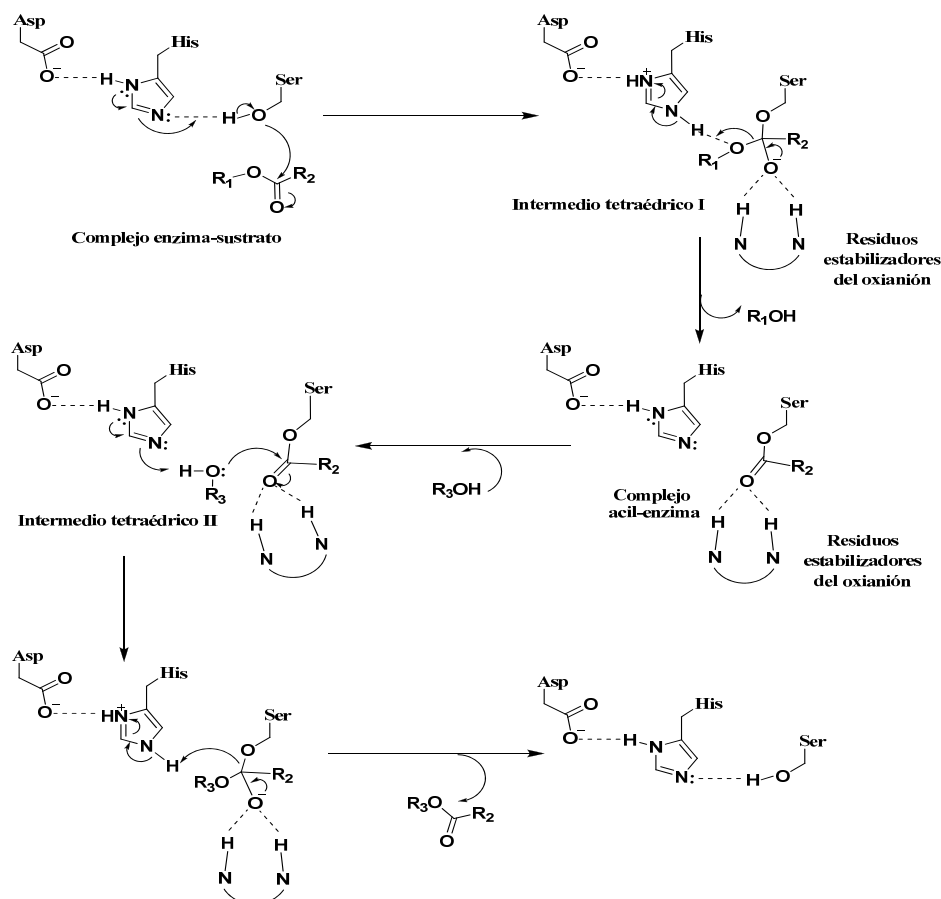
- **Mecanismo catalítico de las lipasas.**

Como ya se ha comentado anteriormente, las lipasas catalizan la hidrólisis de triglicéridos de cadena larga. La versatilidad de estas enzimas hace que sean capaces de llevar a cabo también la hidrólisis de otros sustratos no naturales, así como la síntesis, en medio orgánico, de ésteres y otros compuestos. El mecanismo catalítico de las lipasas (Esquema 1) es similar al descrito para las serín-proteasas,<sup>86-88</sup> estando implicados los aminoácidos que conforman la triada catalítica, con las siguientes etapas:

1. El sustrato ( $R_1COOR_2$ ) accede al centro activo de la enzima (complejo enzima-sustrato), situándose de forma que el carbono carbonílico es atacado por la serina catalítica, a través de su grupo hidroxilo activado. Esta activación se produce por la colocación especial de los tres aminoácidos catalíticos, que provoca una disminución del valor de  $pK$  del grupo hidroxilo de la serina: el protón del grupo  $-OH$  de la serina es captado por el nitrógeno  $N\epsilon$  del anillo imidazólico de la His del centro activo, cuya carga positiva es estabilizada por el aspartato (o glutamato) que forma parte de la triada. Se forma así el primer intermedio tetraédrico (I). La carga negativa, en principio situada en el oxígeno  $O\gamma$  de la serina, sufre una translocación hacia el oxígeno del grupo carbonilo, originándose un oxianión, el cual es estabilizado a través de la formación de uno o varios puentes de hidrógeno con los aminoácidos que constituyen el “hueco oxianiónico”.
2. El intermedio tetraédrico se rompe al transferirse al oxígeno del alcohol saliente el protón previamente cedido a la His, liberándose el alcohol y formándose el complejo acil-enzima.
3. Se produce un segundo ataque nucleofílico por parte del segundo sustrato  $R_3OH$  ( $H_2O$  en sistemas biológicos), previa activación similar a la descrita en el apartado 1, sobre el carbono carbonílico del complejo acil-enzima, formándose un nuevo intermedio tetraédrico (II).
4. El intermedio tetraédrico II colapsa tras la cesión al oxígeno de la serina del H captado por la His a partir del nucleófilo atacante, liberándose el producto (un ácido graso como producto natural) y regenerándose la serina catalítica.

Si el nucleófilo  $R_3OH$  es agua, la lipasa llevará a cabo la hidrólisis del éster sustrato, pero en un entorno con baja actividad de agua otros nucleófilos pueden competir con el agua en el ataque al intermedio acil-enzima, dando lugar a diferentes productos





**Esquema 1.** Mecanismo catalítico de las lipasas.

Otro tipo de hidrolasas que también se han empleado esta memoria son las glicosidasas.

### 1.2.1.2. Glicosidasas

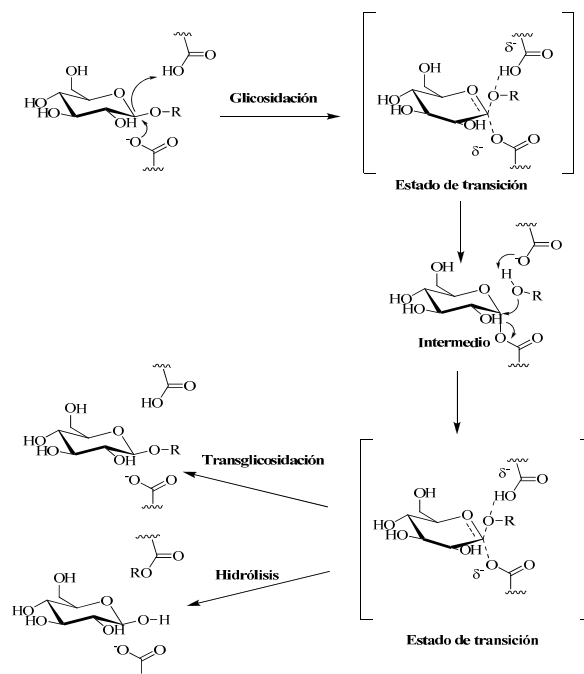
Las glicosidasas o glicosil hidrolasas, EC 3.2, son un grupo de enzimas que *in vivo* catalizan la ruptura de enlaces glicosídicos, participando tanto en el catabolismo como en el anabolismo metabólico de oligosacáridos, aunque la mayoría de ellas son extracelulares y están involucradas en procesos catabólicos. *In vitro*, con una adecuada selección de la enzima y las condiciones de reacción se obtiene una apropiada y rápida síntesis de oligosacáridos, incluso de productos difícilmente de obtener por otros medios, como es el caso de la síntesis del enlace glicosídico  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) usando la endo- $\beta$ -manosidasa de *Lilium longiflorum*.<sup>89</sup>

Estas enzimas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y han sido aisladas de microorganismos, plantas y animales.<sup>90-92</sup> Las glicosidasas microbianas han recibido una atención especial debido a sus aplicaciones industriales y a su gran accesibilidad. Se pueden encontrar en bacterias, levaduras y hongos, y la mayoría son exo-glicosidasas, es decir, que hidrolizan únicamente residuos glicosídicos terminales aunque también existen las endo-glicosidasas, que hidrolizan residuos glicosídicos de una cadena oligosacáridica. Muchas de estas glicosidasas han sido purificadas y secuenciadas, no necesitan la intervención de ningún cofactor y muestra una elevada especificidad por el residuo glicosídico y la naturaleza del enlace glicosídico.

En los últimos años, se ha buscado introducir modificaciones en el centro activo que permitan dirigir la actividad de estas glicosidasas hacia una actuación puramente sintética. En este sentido, se han llevado a cabo ensayos de mutagénesis y evolución dirigida.<sup>93</sup>

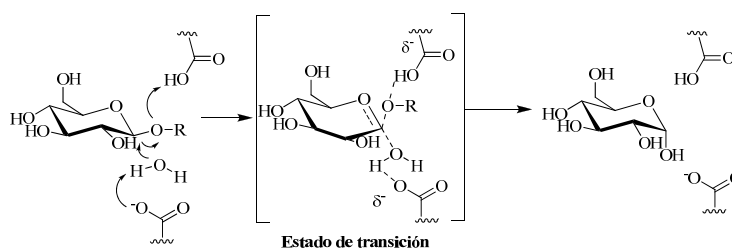
- **Estructura y mecanismo de acción de las glicosidasas.**

El centro activo de las glicosidasas contiene dos residuos de ácido glutámico (Glu<sup>1</sup>, Glu<sup>2</sup>), que pueden actuar como ácido o base respectivamente. En el primer caso, Glu<sup>1</sup> actúa como ácido protonando el oxígeno anomérico y convirtiéndolo en un buen grupo saliente, mientras el residuo glicosilo se une a la enzima (Glu<sup>2</sup>) como ión oxonio. Entonces, el grupo saliente ROH se ve desplazado por la entrada de un nucleófilo (NuH), que normalmente es agua. En el segundo paso, el nucleófilo se desprotona por Glu<sup>1</sup> y se añade a la misma cara de la enzima por la cual se expulsó el grupo saliente. Ambos pasos son vía S<sub>N</sub>2, por lo tanto la configuración del centro anomérico se mantiene (Esquema 2).<sup>94</sup>



**Esquema 2.** Mecanismo de acción de las glicosidasas que retienen la configuración.

Existe también otro tipo de glicosil hidrolasas que invierten la configuración (Esquema 3). Estas enzimas actúan en un solo paso, mediante el cual el nucleófilo desplaza directamente al grupo saliente ROH conduciendo por tanto a una inversión de la configuración del carbono asimétrico.



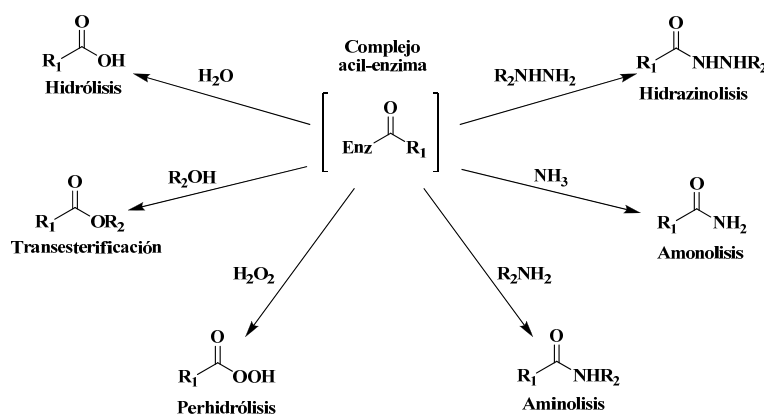
**Esquema 3.** Mecanismo de las glicosidasas con inversión de la configuración.

Existen diferentes tipos de glicosidasas, las cuales van a ser clasificadas dependiendo de qué sustrato donador reconocen, por lo que existen las  $\alpha$  ó  $\beta$  galactosidasas,  $\alpha$  ó  $\beta$  glucosidasas, etc.

### 1.2.1.3. Aplicaciones de lipasas en química orgánica

Las lipasas poseen una elevada versatilidad, propiedad que ha sido utilizada en biotransformaciones para llevar a cabo distintos procesos (Esquema 4):

- Procesos de transferencia de acilo, en los que el ataque de un alcohol conduciría a la formación de ésteres.<sup>95</sup>
- Procesos de aminólisis, como consecuencia del ataque de una amina, dando lugar a la formación de amidas.<sup>96,97</sup>
- Procesos de aminólisis, si el nucleófilo utilizado es  $\text{NH}_3$ .<sup>98,98</sup>
- Formación de per ácidos, cuando el peróxido de hidrógeno actúa como nucleófilo.<sup>100</sup>
- Hidrazinólisis, actuando como nucleófilo una hidracina.<sup>101, 102</sup> La actuación como nucleófilo de una hidroxil amina dará lugar a la formación de derivados de ácido hidroxámico.<sup>103</sup>



**Esquema 4.** Diversidad de reacciones que pueden tener lugar a partir del complejo acil-enzima.

En este contexto se engloba el concepto de “promiscuidad” de las lipasas y de las enzimas en general, referido a la capacidad de estos biocatalizadores de llevar a cabo diferentes transformaciones químicas sobre un amplio número de sustratos, naturales o no.<sup>104-107</sup>

Hult y Berglund,<sup>107</sup> establecen tres tipos de promiscuidad enzimática: debida a las condiciones de reacción, debida a la variedad de sustratos y por último, debida a la actividad catalítica de la enzima. En el primer tipo, algunos autores incluirían la capacidad de muchas enzimas de presentar actividad en su medio no convencional, como es el caso de las lipasas en disolventes orgánicos. El segundo tipo de promiscuidad se refiere al amplio rango de sustratos que pueden ser aceptados por las enzimas, como las lipasas, tal y como se ha descrito anteriormente. El mecanismo de acción sobre estos sustratos es similar en todos ellos, formándose un estado de transición equivalente al que se formaría con un sustrato natural. En este grupo también se incluyen aquellos mutantes con los que se han obtenido enzimas capaces

de tolerar un mayor número de sustratos que la enzima nativa, o con estereoselectividad opuesta, como en el caso de CALB, cuya enantioselectividad fue transformada por Magnusson y cols.,<sup>108</sup> pasando a ser *S*-selectiva en lugar de *R*-selectiva. Un caso similar es el descrito por Bocola y cols.<sup>109</sup> para *Pseudomonas aeruginosa*, que sin presentar la enzima nativa enantioselectividad frente al éster formado a partir de *p*-nitrofenol y ácido 2-metildecanoico, este grupo obtuvo un mutante *S*-selectivo y otro *R*-selectivo. Sobre esta misma lipasa también se han llevado a cabo mutaciones, consiguiendo aumentar su enantioselectividad en la resolución de alenos racémicos.<sup>110</sup> De esta forma, mediante las diversas técnicas de biología molecular, a través de las cuales se obtienen diferentes mutantes enzimáticos, se está logrando la obtención de biocatalizadores activos frente a un mayor rango de sustratos<sup>111</sup> y más enantioselectivos.<sup>112</sup>

Por último, el último tipo de promiscuidad enzimática mencionado, se refiere a la capacidad del sitio activo de las enzimas para catalizar más de una transformación química. Algunos investigadores han desarrollado otro tipo de reacciones, mediante el aprovechamiento de la maquinaria catalítica de las lipasas: el grupo de Gotor<sup>113</sup> ha demostrado cómo se puede llevar a cabo una reacción de adición de Michael catalizada por la lipasa B de *Candida antártica* (Esquema 5), a partir de acrilonitrilo y diferentes aminas secundarias.



**Esquema 5.** Reacción de Michael catalizada por la lipasa B de *Candida Antartica*.<sup>113</sup>

Así mismo, en la bibliografía aparecen descritas otras innovadoras aplicaciones sintéticas de lipasas, como son las reacciones de formación de enlace C-C catalizadas por mutantes de CALB (mutantes Ser105Ala y Ser105Gly), que mostraron actividad aldolasa.<sup>114</sup> También se demostró esta actividad en la lipasa nativa, pero en menor grado. Recientemente se ha demostrado que también algunas enzimas pueden llevar a cabo transformaciones químicas nuevas, en las que estaría implicado un centro catalítico diferente al que normalmente interviene en la actividad catalítica de la enzima.<sup>80</sup>

Esta gran habilidad de las enzimas de presentar actividad frente a un amplio rango de sustratos, bajo diferentes condiciones, así como la mejora de biocatalizadores que se está logrando a través de ingeniería genética, supone un gran potencial en su aplicación.

Dentro de las diversas aplicaciones de las lipasas en el campo de las biotransformaciones, en esta Tesis nos centraremos en la aplicación de estas enzimas en la resolución cinética y resolución cinética dinámica de mezclas racémicas de diversos tipos de alcoholes secundarios mediante procesos de transferencia enantioselectiva de grupos acilo.

### 1.2.1.3.1. Resoluciones cinéticas y cinéticas dinámicas de alcoholes secundarios.

Existen diversas metodologías para la resolución de mezclas racémicas, mediante procesos de cristalización, métodos cromatográficos, o procesos de resolución cinética (KR). Estos últimos son una de las metodologías más empleadas para la obtención de moléculas quirales. Un proceso de KR se define como un proceso en el que los dos enantiómeros de una mezcla racémica son transformados en el correspondiente producto por un reactivo quiral, con diferente velocidad de reacción ( $k_R > k_S$ ). Este reactivo quiral debe encontrarse en cantidades catalíticas y puede tratarse de un catalizador químico (un ácido o base quiral, un complejo metálico quiral, etc.) o un biocatalizador (enzima o microorganismo). En el caso ideal, la diferencia de velocidad de reacción es tal, que uno de los enantiómeros reacciona muy rápidamente para dar el producto correspondiente y el otro enantiómero no reacciona de manera perceptible y puede ser recuperado al final del proceso.

Actualmente, la utilización de catalizadores enzimáticos en procesos de resolución de mezclas racémicas se puede considerar como una herramienta habitual en el ámbito de la síntesis orgánica.<sup>65, 115-118</sup> Los biocatalizadores más empleados en procesos de resolución cinética de alcoholes, ésteres, ácidos y aminas son las lipasas.<sup>85</sup>

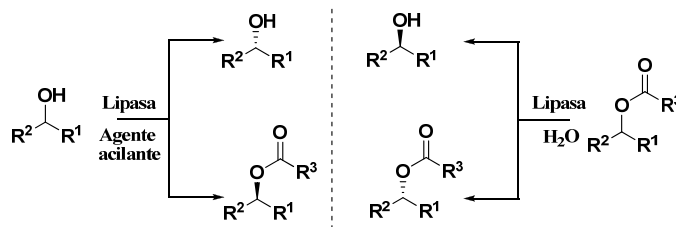
Entre las principales razones por las que las lipasas presentan una amplia utilidad en biotecnología, destacan los siguientes aspectos:

- Su estabilidad en medios orgánicos.
- El hecho de que no requieran cofactores.
- Admiten gran variedad de sustratos no naturales.
- Su regio-, enantio- y quimioselectividad.<sup>70, 75, 119</sup>
- Su eficacia catalítica, lo que implica bajas energías de activación y condiciones de reacción, en cuanto a temperatura y pH, moderadas, lo que reduce los requerimientos energéticos y degradación térmica de los productos.
- A todos estos aspectos cabría añadir que hoy en día son accesibles comercialmente una amplia variedad de lipasas, tanto en su forma libre como inmovilizada.

En este tipo de reacciones de resolución cinética, la enzima debe ser capaz de discriminar entre los dos enantiómeros del racémico, de forma que presente mayor afinidad por uno de ellos, que será transformado en producto a una velocidad mucho mayor que el otro ( $k_R \gg k_S$ ). La concentración de cada enantiómero varía durante el transcurso de la reacción, por lo que la velocidad de reacción de ambos varía con la conversión, al igual que los excesos enantioméricos del sustrato y del producto. Para poder comparar correctamente dos KR se debe hacer a una determinada conversión. Sih desarrolló una serie de ecuaciones<sup>120</sup> para calcular fácilmente la enantioselectividad de una KR enzimática que desarrollaremos en apartados posteriores. Esta enantioselectividad, llamada “Cociente Enantiomérico” ( $E$ ), mide la capacidad de una enzima de diferenciar entre dos enantiómeros; es un valor constante a lo largo de la reacción y permite

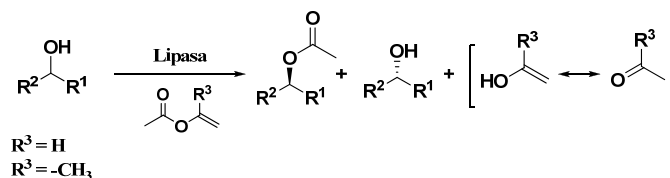
comparar dos procesos de resolución enzimática. Cuanto mayor sea el valor de  $E$ , mejor será la resolución. Como regla general, valores de  $E$  menores de 15 no tienen aplicación, valores comprendidos entre 15 y 30 se consideran moderados y valores de  $E$  superiores a 30 son buenos o excelentes. Si el proceso es eficiente, uno de los enantiómeros será completamente transformado en producto, mientras que el otro permanecerá intacto, obteniendo una mezcla final del 50 % producto (( $R$ )-producto)) y 50 % sustrato (( $S$ )-sustrato).

Los compuestos más empleados como sustratos de una resolución cinética catalizada por lipasas son alcoholes secundarios, no sólo por su importancia como sintones, sino también por la mayor enantioselectividad que estos biocatalizadores presentan hacia este tipo moléculas. Existen descritos un gran número de procesos catalizados por lipasas para la obtención de alcoholes secundarios enantioméricamente puros mediante resolución cinética de mezclas racémicas, a través de procesos de hidrólisis del derivado acilado o transesterificación con diferentes agentes acilantes (Esquema 6).<sup>65, 85, 118, 121</sup>



**Esquema 6.** Procesos catalizados por lipasas para la obtención de alcoholes secundarios enantioméricamente puros mediante resolución cinética.

La elección del agente acilante se realiza en función del biocatalizador y el sustrato en cuestión. En el caso de alcoholes secundarios, los ésteres activados, tales como ésteres enólicos tipo acetato de vinilo ó acetato de isopropenilo (Esquema 7), son los reactivos de elección para evitar la reversibilidad del proceso. Utilizando acetato de vinilo como donador de acilo, se forma alcohol vinílico en el proceso, que sufre una tautomería ceto-enólica, originando acetaldehído, mientras que la utilización de acetato de isopropenilo provocará la formación de acetona, haciendo el proceso prácticamente irreversible en ambos casos.

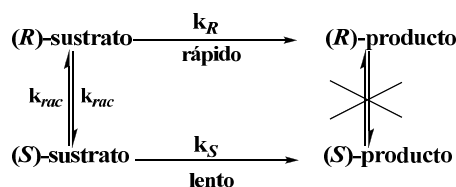


**Esquema 7.** Resolución cinética con tautomería ceto-enólica.

Los procesos de resolución cinética-dinámica (DKR) (Esquema 8) son los que mayor interés han despertado en los últimos años. Consiste en la combinación de un proceso de resolución cinética con la racemización *in situ* del enantiómero remanente del sustrato, de forma que se pueda lograr una conversión teórica del 100 %. El enantiómero por el que la enzima presenta menor afinidad, será continuamente transformado en el enantiómero opuesto, que será

convertido por el biocatalizador, obteniendo un sólo producto ópticamente puro o enriquecido. Para que el proceso sea eficaz, deben reunirse diversos requerimientos:

- Elección de un proceso de resolución cinética eficaz ( $k_R \gg k_S$ ) e irreversible.
- La velocidad de racemización del sustrato debe ser mayor que la velocidad de conversión del mismo ( $k_{rac} > k_R$ ), si no, una elevadísima enantioselectividad es imprescindible.
- El proceso de resolución y el proceso de racemización deben ser compatibles.

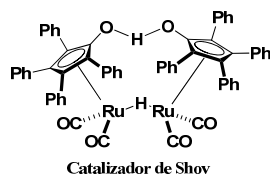


**Esquema 8.** Proceso de resolución cinética-dinámica.

La racemización del sustrato puede ser llevada a cabo mediante un proceso químico, biocatalítico o espontáneo, pero debe ser elegido de forma que no ocasione la racemización del producto y que no interfiera con la actividad de la enzima.

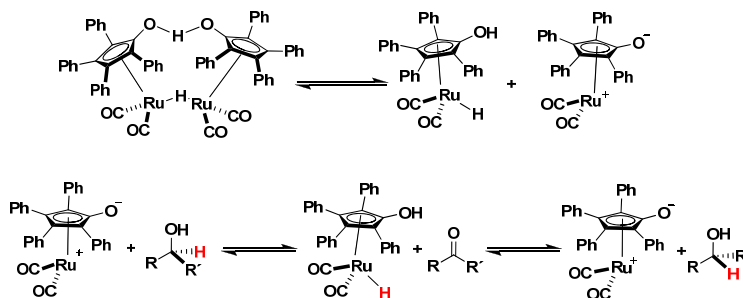
En la década de los 90 el gran desarrollo y aplicación de los procesos de resolución cinética llevó a muchos investigadores a solucionar las limitaciones de estos procesos, dándose los primeros pasos en los procesos de resolución cinética-dinámica.<sup>122</sup> La aproximación más simple consistía en la combinación de una enzima que llevase a cabo el proceso resolutivo, y una racemización del sustrato en medio básico, pero esta estrategia está limitada a sustratos que contengan un protón ácido en el centro estereogénico, como derivados de ácidos carboxílicos  $\alpha$ -sustituidos o cetonas  $\alpha$ -sustituidas. Además, se puede producir la racemización indeseada del producto quiral.

Desde que en 1997 Stürmer señalase la importancia de la combinación de enzimas y metales de transición,<sup>123</sup> este concepto ha adquirido gran relevancia en la comunidad científica. Los grupos de Williams y Bäckvall fueron los primeros en presentar esta combinación en un proceso de DKR de alcoholes secundarios. El grupo de Williams llevó a cabo la resolución dinámica de fenil etanol utilizando la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* (PFL) y  $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$  como catalizador de la racemización.<sup>124</sup> Bäckvall y cols. emplearon un catalizador de rutenio (catalizador de Shvo) (Figura 1) para llevar a cabo la racemización del sustrato, en combinación con lipasas como CALB o la lipasa de *Pseudomonas cepacia*, obteniendo alcoholes secundarios acilados con elevados excesos enantioméricos y conversiones.<sup>125, 126</sup>



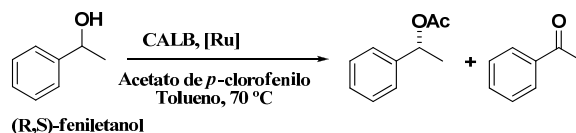
**Figura 1.** Catalizador de Shvo.

Este complejo dimérico de rutenio fue sintetizado por Shvo *y cols.*<sup>127</sup> y su versatilidad ha hecho que haya sido muy utilizado en síntesis orgánica.<sup>128</sup> Una de las ventajas que presenta, es que no necesita la presencia de una base para su activación como otros catalizadores de rutenio, lo que podría interferir en la actividad enzimática o en la racemización de sustrato y producto, ya que uno de los oxígenos del ligando actúa como centro básico. Presenta activación térmica: al aumentar la temperatura el dímero se disocia en dos complejos de rutenio (Esquema 9), que son las especies activas, que llevarán a cabo la oxidación y reducción del sustrato a través de un proceso de transferencia de hidrógeno.



**Esquema 9.** Activación y mecanismo de acción del catalizador de Shvo.

La elección del agente acilante es también crucial en un proceso de DKR. Los compuestos carbonílicos formados durante el proceso resolutivo a partir de los ésteres enólicos comúnmente empleados como donadores de acilo, pueden interferir en la actividad del catalizador de Rutenio. Por ello Bäckvall *y cols.* plantearon la utilización de ésteres arílicos con sustituyentes electro-atrayentes como agentes acilantes. Entre los diferentes agentes probados, los mejores resultados se obtuvieron con el acetato de *p*-clorofenilo (Esquema 10).<sup>126</sup> Este compuesto da lugar a la formación de *p*-clorofenol, que no interfiere en la racemización del sustrato, obteniendo excelentes resultados en la DKR de diferentes alcoholes secundarios.<sup>129-131</sup> Otro tipo de ésteres activados también utilizados en procesos de transesterificación son ésteres de tricloroetilo<sup>95</sup> y ésteres de trifluoroetilo,<sup>132</sup> donadores de acilo de elección en algunos procesos de DKR.

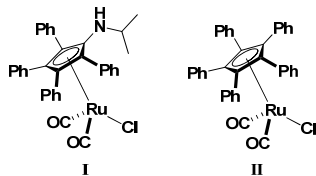


**Esquema 10.** DKR de (*R*, *S*)-fenil etanol utilizando acetato de *p*-clorofenilo como agente acilante.<sup>126</sup>

Kim, Park *y cols.* prepararon en 2002 un nuevo precatalizador de rutenio (**I**, Figura 2) para llevar a cabo la racemización de alcoholes secundarios a temperatura ambiente,<sup>133, 134</sup> lo que suponía poder aplicar esta metodología a sustratos degradables a elevadas temperaturas y la utilización de enzimas menos termoestables. Además permitía la utilización de acetato de isopropenilo, comercialmente accesible, como donador de acilo. La racemización del alcohol era muy rápida a temperatura ambiente; sin embargo, la combinación de un proceso de



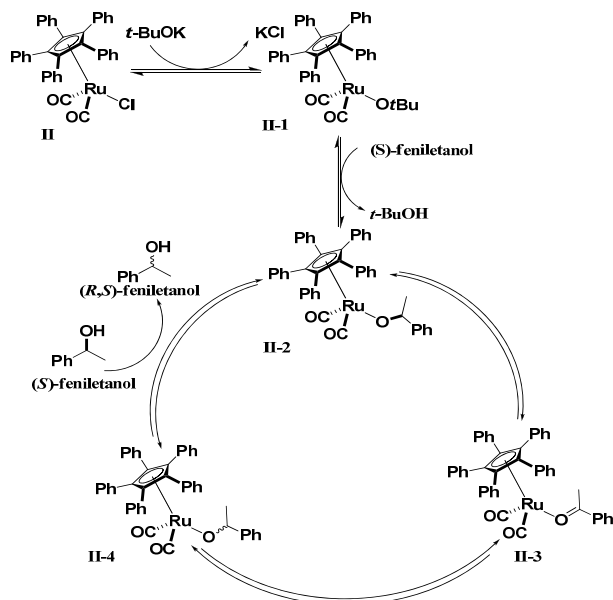
resolución enzimática y de racemización catalizada por este complejo de rutenio suponía procesos de DKR de duración de entre 1 y 7 días. Poco tiempo después, el grupo de Bäckvall desarrolló otro complejo de rutenio <sup>135</sup> (**II**, Figura 3) con el que se podía llevar a cabo procesos de DKR de alcoholes secundarios en tiempos extraordinariamente cortos.<sup>136, 137</sup>



**Figura 2.** Complejos de rutenio desarrollados por el grupo de Kim y Park (**I**) y por el grupo de Bäckvall (**II**).

Este precatalizador debe activarse previamente con *t*BuOK, para formar un alcóxido que será la especie activa. Además, este catalizador presenta una peculiaridad en su mecanismo de acción: el compuesto carbonílico, resultante de la oxidación del alcohol sustrato, permanece anclado al complejo de rutenio durante la racemización, sin abandonar la esfera de coordinación, hasta que es reducido de nuevo. En el Esquema 11 se muestra este mecanismo en la racemización de (*S*)-fenil etanol.

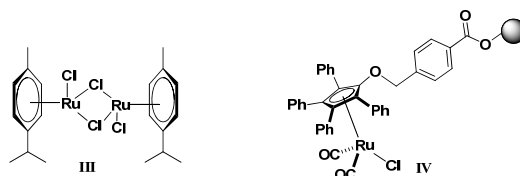
Tanto la metodología de Bäckvall como la de Kim y Park, así como diferentes combinaciones de metales de transición y procesos de resolución enzimática, se han aplicado a una gran variedad de alcoholes secundarios con sustituyentes alquílicos y aromáticos,<sup>138-143</sup> y a la resolución de dioles<sup>144, 145</sup> y aminas.<sup>131, 146, 147</sup>



**Esquema 11.** Racemización de (*S*)-fenil etanol por la acción del catalizador desarrollado por el grupo de Bäckvall (**II**).

Otros catalizadores de rutenio han sido diseñados u otros ya existentes han sido utilizados, con el fin de optimizar procesos de DKR de diferentes sustratos,<sup>148, 149</sup> como el complejo de cimeno y rutenio utilizado por Kim y Park en la resolución de alcoholes alílicos a

temperatura ambiente <sup>150</sup> (Figura 3, **III**) y derivados de este sistema <sup>151</sup> o un complejo inmovilizado sobre un soporte polimérico desarrollado por el primer grupo. <sup>152</sup> (Figura 3, **IV**).



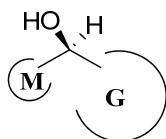
**Figura 3.** Catalizadores de rutenio empleados en la resolución cinética-dinámica de alcoholes secundarios.

- **Enantioselectividad en procesos de resolución cinética catalizados por lipasas.**

En un proceso de resolución cinética irreversible de una mezcla racémica de alcoholes secundarios catalizado por una lipasa, como los que desarrollaremos en esta Memoria, la pureza enantiomérica del producto y del sustrato de partida varían a lo largo de la evolución de la reacción.

Las cinéticas de las reacciones de transferencia de acilo catalizadas por lipasas en medio orgánico corresponde a un mecanismo de reacción de tipo “ping-pong bi bi”, <sup>153</sup> que es una variación del modelo de Michaelis-Menten definido para reacciones con dos sustratos y que se desarrolla en dos etapas.

La estereoselectividad de la mayoría de las lipasas hacia los alcoholes secundarios se puede predecir a través de reglas empíricas. Se han desarrollado diversos modelos basados en pruebas con diferentes sustratos, para predecir la preferencia enantiomérica de las lipasas. <sup>87, 154-157</sup> El modelo más sencillo que predice el enantiómero del alcohol secundario que será más rápidamente reconocido por la enzima es el modelo descrito por Kazlauskas *y cols.*, <sup>87, 158</sup> que se basa en la comparación de los tamaños de los sustituyentes del estereocentro. Así, si el alcohol se dibuja con el grupo hidroxilo hacia fuera del plano (Figura 4), el enantiómero reconocido preferentemente por la lipasa presenta el sustituyente de mayor tamaño a la derecha y el sustituyente de tamaño medio a la izquierda. Esta regla establece que la mayoría de las lipasas presentan la misma enantiopreferencia frente a un determinado sustrato, pero difieren en su enantioselectividad. El centro activo de la lipasa se traslada a un modelo constituido por dos bolsillos de diferente tamaño: el enantiómero del alcohol que reacciona más rápido encaja perfectamente su sustituyente más pequeño en el bolsillo de tamaño medio, mientras que el más lento es forzado a acomodar en ese bolsillo el sustituyente más grande; estos problemas estéricos interfieren en la actividad de la triada catalítica, ralentizando la reacción de este enantiómero.

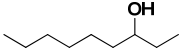
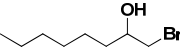
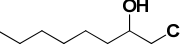
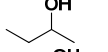
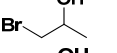
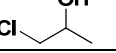


**Figura 4.** Regla de Kazlauskas.

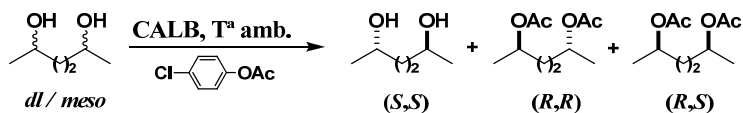
Esta regla sugiere una estrategia para aumentar la enantioselectividad de las lipasas. Cuanto más similar es el tamaño de los sustituyentes a ambos lados del estereocentro, peor es la enantioselectividad. Por tanto, aumentando químicamente la diferencia de tamaño, se incrementará la estereoselectividad del proceso. Según Ema,<sup>159</sup> la enantioselectividad resulta de reducir enormemente la actividad de la enzima hacia el “el enantiómero que reacciona lentamente”, no de aumentar la actividad del que reacciona más rápidamente. Esta estrategia ha sido utilizada por diversos grupos, obteniendo excelentes resultados<sup>130, 160</sup> o incluso se ha logrado revertir la enantioselectividad enzimática aumentando el tamaño del sustituyente de tamaño medio, de forma que se convierta en el grande.<sup>161</sup>

A través de la determinación mediante rayos-X de análogos del estado de transición de diversas lipasas, se ha podido comprobar cómo esta regla se ajusta al modelo encontrado en la estructura terciaria de diferentes lipasas. Se ha demostrado cómo el sitio de unión al alcohol está formado por una hendidura con dos regiones claramente diferenciadas: una grande e hidrofóbica, abierta hacia el medio, y otra más pequeña denominada “bolsillo estereoselectivo”. Los modelos estructurales de otras lipasas ampliamente utilizadas en la resolución de alcoholes secundarios, como son la lipasa de *Burkholderia cepacia*,<sup>162</sup> o la lipasa B de *Candida antarctica*,<sup>163</sup> establecidos también mediante la determinación por rayos-X de análogos del estado de transición, muestran una estructura similar a la ya descrita. Mediante técnicas de modelado molecular se ha podido demostrar como en esta lipasa la orientación del enantiómero del sustrato preferentemente reconocido sería de acuerdo a la mencionada regla.<sup>164, 165</sup> Así mismo, se han realizado diversos estudios de dinámica molecular con esta lipasa,<sup>166-169</sup> con el fin de estudiar con mayor profundidad el reconocimiento enantioselectivo de alcoholes secundarios por CALB, e identificar los residuos implicados en el proceso, como son Thr42, Ser47 y Trp104, localizados en el bolsillo estereoselectivo. Estudios similares se han llevado a cabo con otras lipasas, como la mencionada anteriormente, *Burkholderia cepacia*.<sup>170, 171</sup> Sin embargo, se ha comprobado que las interacciones estéricas entre el sustrato y el centro activo no son el único factor que determina la enantioselectividad. Rotticci y cols. demostraron que factores electrostáticos podían influir también en la estereoselectividad, mediante la resolución catalizada por CALB de alcoholes alifáticos y sus análogos halogenados.<sup>164-172</sup> Como se muestra en la Tabla 1, las halohidrinas 1-bromo-2-octanol y 1-cloro-2-octanol son discriminadas de una forma mucho menos selectiva que el análogo 3-nonanol. Tanto el grupo etilo como el grupo bromo metileno tienen un tamaño similar, luego es algún efecto electrónico el que hace perder la enantioselectividad a la lipasa. Lo contrario ocurre si el átomo de halógeno se encuentra en el sustituyente de mayor tamaño: la enantioselectividad aumenta considerablemente.

**Tabla 1.** Sustratos empleados en la resolución cinética catalizada por CALB.

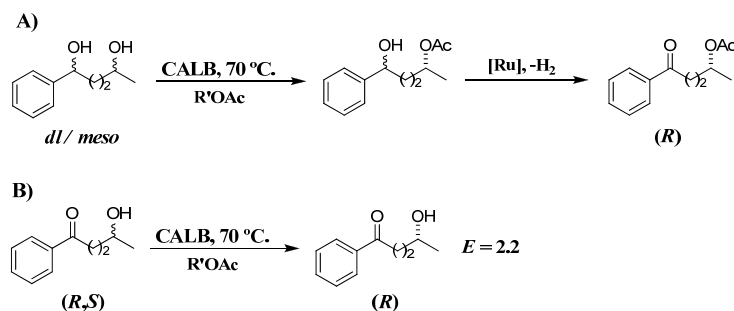
	Sustrato	<i>E</i>
1		340
2		7
3		14
4		9
5		371
6		164

En otros casos, se han observado cambios en la estereoselectividad en función de los sustituyentes del sustrato. El grupo de Bäckvall indicó que la presencia de un grupo éster cercano al centro estereogénico influía en el proceso de resolución de 1,4-dioles (Esquema 12).<sup>173</sup> Este efecto no aparecía en la resolución de 1,3-dioles. La influencia del reconocimiento de un centro estereogénico por la lipasa, distanciado del grupo éster o hidroxilo que interviene en la reacción, ya había sido objeto de estudio por otros grupos.<sup>174, 175</sup> Bäckvall y *cols.* observaron que en la resolución de 2,5-hexanodiol catalizada por CALB, uno de los grupos hidroxilo era acilado de acuerdo a la regla de Kazlauskas y, sin embargo, la lipasa perdía enantioselectividad frente al otro.

**Esquema 12.** Resolución de 2,5-hexanodiol catalizada por CALB.

Tras diferentes estudios, estos autores determinaron que el efecto electronegativo del grupo éster formado tras la acilación del primer hidroxilo, influía en la enantioselectividad de la lipasa hacia el segundo.

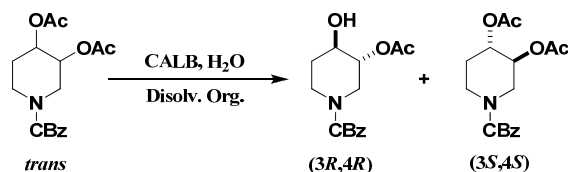
Un efecto similar fue también observado por el grupo de Bäckvall en la síntesis de  $\alpha$ -hidroxicetonas enantioméricamente puras (Esquema 13).<sup>136</sup> En los diferentes ensayos que llevaron a cabo, observaron que la lipasa CALB perdía la enantioselectividad en presencia de un grupo carbonilo: si la resolución de 1-fenil-4-hidroxi-1-pentanona se llevaba a cabo a partir del correspondiente diol y posterior oxidación del hidroxilo no acilado (A), se obtenía el producto enantiopuro. Si la resolución se llevaba a cabo directamente a partir de 1-fenil-4-hidroxi-1-pentanona, la presencia del grupo carbonilo hacía perder la enantioselectividad a la lipasa (B).



**Esquema 13.** Efecto del grupo carbonilo en la enantioselectividad de CALB en el proceso de DKR de 1,4-hidroxicetonas.

Recientemente mediante estudios de dinámica molecular, este mismo grupo ha establecido la posible causa de este fenómeno.<sup>174</sup> Durante la formación del intermedio tetraédrico se produce una repulsión electrostática entre el grupo carbonilo del sustrato y el grupo carbonilo del residuo Thr40 (residuo del hueco oxianiónico), de forma que se provoque una elevación del sustrato, forzando una conformación en el sitio activo de la lipasa que hace que ésta no pueda discriminar entre los dos enantiómeros.

El efecto producido por diferentes grupos cercanos al estereocentro ha sido estudiado también por otros grupos. Mediante la resolución cinética del derivado acetilado (Esquema 14) de *trans*-3,4-dihidroxipiperidina-*N*-protegida, catalizada por CALB, el grupo de Gotor obtuvo el derivado monoacetilado ópticamente activo, en un proceso regio- y enantioselectivo.<sup>98</sup> Sin embargo, la enantioselectividad (no la regioselectividad) se perdía al llevar a cabo el proceso resolutivo mediante un proceso de transesterificación a partir del correspondiente *trans*-diol. También observaron la pérdida de la selectividad en la resolución del sustrato *cis*-diol, bien mediante transesterificación, bien mediante hidrólisis del di acetato. Se han desarrollado diversos estudios sobre la estructura de CALB, ya elucidada, y su reactividad y selectividad hacia alcoholes y aminas mediante modelado molecular. El grupo de Gotor llevó a cabo también un estudio de modelado para explicar los datos experimentales obtenidos, determinando la influencia del sustituyente 3-*O*-acetilo en la selectividad de la lipasa.



**Esquema 14.** Resolución cinética de *trans*-3,4-dihidroxipiperidina-*N*-protegida.<sup>98</sup>

Mediante técnicas cristalográficas se ha podido elucidar la estructura tridimensional de diversas enzimas y, actualmente, a través de las diferentes técnicas de modelado molecular se pueden relacionar estas estructuras tridimensionales con las observaciones experimentales de su comportamiento frente a diferentes sustratos y condiciones. Los avances conseguidos en la determinación estructural de diferentes biocatalizadores han abierto la posibilidad de realizar un diseño racional de nuevos catalizadores y nuevas reacciones.

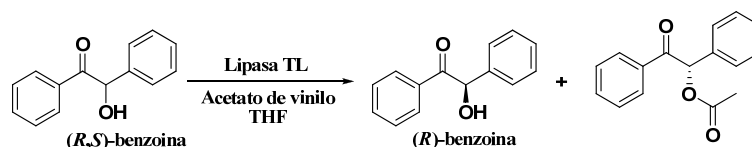
### 1.2.1.3.2. Resoluciones cinéticas y cinéticas dinámicas de compuestos $\alpha$ -hidroxicarbonílicos.

Los compuestos  $\alpha$ -hidroxicarbonílicos ópticamente activos,  $\alpha$ -hidroxiácidos,  $\alpha$ -hidroxialdehídos y  $\alpha$ -hidroxicetonas, constituyen sintones indispensables en síntesis asimétrica, debido a la gran versatilidad de sus grupos funcionales, que pueden ser fácilmente transformados en otros grupos, como dioles, halo- y aminoderivados o epóxidos.

Frente al elevado número de resoluciones de alcoholes secundarios, no son muchos los procesos de resolución de  $\alpha$ -hidroxicetonas que pueden encontrarse en la bibliografía; la gran mayoría de ellos se han descrito mediante hidrólisis enantioselectiva del correspondiente éster. Entre los primeros procesos descritos se encuentra la obtención de aciloínas ópticamente activas a través de la hidrólisis del correspondiente éster catalizado por la lipasa LPL de *Pseudomonas sp.*, pero los valores de exceso enantiomérico conseguidos eran bajos o moderados.<sup>176</sup> Posteriormente se lograron mejores resultados con sustratos derivados de aciloínas, catalizados por la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* (lipasa Amano AK) y lipasa PS.<sup>177, 178</sup> Por otra parte, Tanyeli y cols. describieron la hidrólisis de ésteres de  $\alpha$ -hidroxicetonas cíclicas, catalizada por la esterasa de hígado porcino,<sup>179</sup> y 10 años más tarde llevaron a cabo la hidrólisis de  $\alpha$ -acetoxicetonas cíclicas  $\alpha$ -sustituidas, para las que presentaba mayor enantioselectividad la lipasa de *Candida rugosa* (CRL).<sup>180</sup> También aparece en la bibliografía la resolución de  $\alpha$ -acilketonas,  $\alpha,\beta$ -insaturadas, obteniéndose los mejores resultados con la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB), que presentaba diferente enantiopreferencia en función de los sustituyentes del compuesto.<sup>181</sup>

Kajiro y cols. llevaron a cabo un screening de lipasas para llevar a cabo la síntesis de 2-hidroxi-1-indanona enantioméricamente pura, precursor de un agente antiviral.<sup>182</sup> Scheid y cols. realizaron un cribado de lipasas como catalizadores de la resolución cinética de diferentes aciloínas alifáticas y aromáticas, obteniendo los valores más elevados de exceso enantiomérico y conversión en el caso de CALB y la lipasa de *Pseudomonas cepacia* (PCL o BCL).<sup>183</sup> Recientemente Jeon y cols.<sup>184</sup> han desarrollado un proceso de resolución cinética de 1-fenil-2-hidroxiopropanonas halogenadas, alcanzando elevadas conversiones y excesos enantioméricos. Aunque estos procesos biocatalíticos de resolución cinética de alcoholes secundarios suelen llevarse a cabo con enzimas aisladas, Demir y cols., utilizaron células enteras de *Rhizopus oryzae* como catalizador de la hidrólisis enantioselectiva de  $\alpha$ -hidroxi-aril-alkilcetonas.<sup>185, 186</sup>

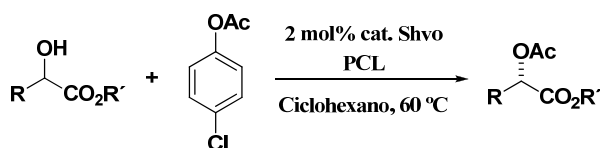
Los primeros en describir una resolución cinética de benzoína fueron Aoyagi y cols., en un proceso catalizado por la lipasa de *Pseudomonas stutzeri* (Lipasa TL<sup>®</sup>) en THF.<sup>187</sup> Esta lipasa poco común, ha sido incluida en diversos screenings,<sup>188-192</sup> pero muy pocas veces ha resultado ser el biocatalizador de elección en un proceso resolutivo.<sup>193-195</sup> En la búsqueda de lipasas realizada por Aoyagi y cols., la Lipasa TL<sup>®</sup> era la única capaz de admitir benzoína (Esquema 15) como sustrato de la acilación, presentando una enantioselectividad muy elevada.



**Esquema 15.** Resolución cinética de benzoína catalizada por la lipasa de *Pseudomonas stutzeri* (Lipasa TL<sup>®</sup>).

La benzoína se ha utilizado también como sustrato en otros procesos de resolución cinética<sup>185, 186, 196</sup> pero en ninguno se han alcanzado los excelentes valores de enantioselectividad logrados mediante la utilización de la lipasa de *Pseudomonas stutzeri* como catalizador.

Son pocas, las metodologías que aparecen descritas en la bibliografía para llevar a cabo la DKR de compuestos hidroxycarbonílicos, principalmente en el caso de  $\alpha$ -hidroxicetonas. Se han desarrollado DKRs de  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -hidroxiésteres,<sup>197-199</sup> combinando la utilización del catalizador de Shvo para la racemización del sustrato y una resolución cinética catalizada por PCL. En el Esquema 16 se muestra el proceso llevado a cabo por el grupo de Bäckvall para la DKR de  $\alpha$ -hidroxiésteres,<sup>129</sup> con el que se obtienen elevados rendimientos y excesos enantioméricos en el caso de sustratos aromáticos, y más moderados con compuestos alifáticos.

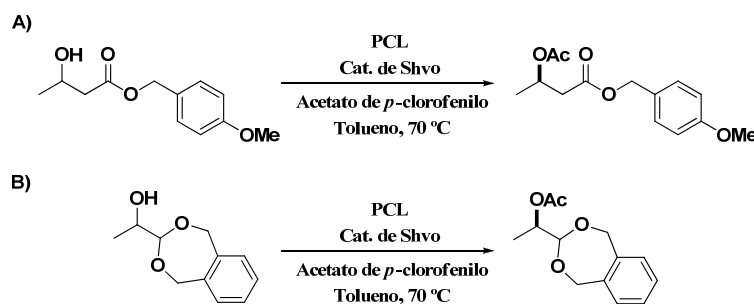


**Esquema 16.** Proceso de DKR de  $\alpha$ -hidroxiésteres.<sup>129</sup>

Los sustratos de  $\gamma$ - y  $\delta$ -hidroxiésteres<sup>198, 199</sup> son susceptibles de sufrir lactonización espontánea o catalizada por la misma lipasa que cataliza el proceso de resolución, por lo que el éster se substituyó por amidas, menos reactivas que los correspondientes ésteres, substituidas con grupos voluminosos como *N*, *N*-diisopropil-4-hidroxipentanamida. En estos casos además, la acumulación del sustrato oxidado (intermedio del proceso de racemización) era mucho mayor que en otros procesos similares, por lo que se utilizaron H<sub>2</sub> o 2,4-dimetil-3-pentanol como fuentes de hidrógeno.

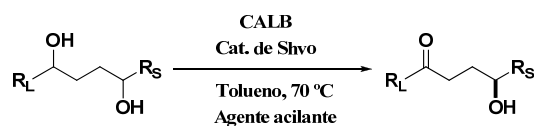
En algunos casos, la obtención de compuestos hidroxycarbonílicos enantioméricamente puros a través de procesos de DKR catalizados por lipasas y metales de transición, se realizó a partir de sustratos que posteriormente derivasen a la función hidroxycarbonílica. Kim y Park llevaron a cabo la DKR de hidroxiaácidos y  $\alpha$ - y  $\beta$ -hidroxialdehídos,<sup>130</sup> utilizando grupos voluminosos protectores del grupo carbonilo. De esta forma, se aumenta la diferencia de tamaño de los sustituyentes alrededor del estereocentro, incrementando la enantioselectividad de la lipasa. La DKR de hidroxiaácidos se desarrolló utilizando como sustratos  $\beta$ -hidroxibutiratos de bencilo, (*p*-metoxifenil) metilo (Esquema 12, A), bifenilmetilo o *tert*-butilo; como grupo protector de hidroxialdehídos utilizaron 1,2-bencenodimetanol (Esquema 17, B). Los excesos

enantioméricos y conversiones conseguidos, utilizando PCL, fueron muy elevados, pero tras largos tiempos de reacción (3-5 días).



**Esquema 17.** Proceso de DKR de sustratos que posteriormente deriven a la función hidroxycarbonílica.

Martín-Matute y Bäckvall llevaron a cabo la síntesis de  $\alpha$ -hidroxicetonas a partir de 1,4-dioles, en un proceso de “transformación asimétrica cinética-dinámica” (DYKAT).<sup>136</sup> El término de resolución cinética-dinámica se refiere únicamente a enantiómeros de una mezcla racémica; si el compuesto es una mezcla de diastereoisómeros, como es el caso de 1,4-dioles, se habla entonces de transformación asimétrica. Utilizaron como sustratos 1,4-dioles asimétricos, con un grupo grande ( $R_L$ , Esquema 18) y otro pequeño ( $R_S$ ), de forma que sólo un grupo hidroxilo (el menos impedido estéricamente) fuese accesible a la lipasa, y el otro fuese oxidado por el complejo de rutenio.



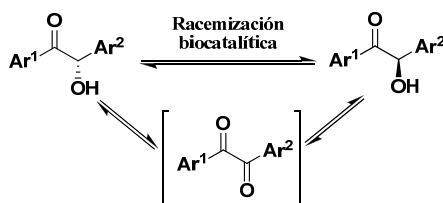
**Esquema 18.** Síntesis de  $\gamma$ -hidroxicetonas.<sup>136</sup>

En 2005 el grupo de Bornscheuer<sup>200</sup> describió la primera DKR de  $\alpha$ -hidroxicetonas tipo aciloínas, sin utilizar metales de transición como catalizadores de la racemización del sustrato. Este tipo de sustratos son susceptibles de sufrir una isomerización en medio ácido o básico. Tras diferentes ensayos de racemización del sustrato y de compatibilidad entre el biocatalizador utilizado y el sistema de racemización, encontraron que las mejores condiciones para llevar a cabo el proceso era establecer un reactor con 2 compartimentos espacialmente separados, conectados con una bomba: en uno tenía lugar la resolución cinética enzimática, catalizada por CALB y en el otro la racemización del alcohol remanente por la acción de una resina ácida (Amberlyst 15).

Como ya se comentó anteriormente, la racemización del sustrato se puede llevar a cabo de diferentes formas, entre ellas, a través de un proceso biocatalítico.<sup>201</sup> La utilización de una enzima en lugar de metal de transición, representa una atractiva opción para desarrollar procesos de DKR, dadas las condiciones suaves de temperatura y presión en las que suelen trabajar los biocatalizadores. Las enzimas de elección para catalizar estos procesos, son las racemasas.<sup>202</sup> Probablemente, la más estudiada es la “mandelato-racemasa”, que presenta actividad frente a un



amplio número de  $\alpha$ -hidroxiácidos  $\beta,\gamma$ -insaturados.<sup>203</sup> Sin embargo, es inactiva frente a sus análogos alifáticos, limitación superada con la utilización de células enteras de *Lactobacillus* spp.<sup>204, 205</sup> El grupo de Faber ha llevado a cabo diversos estudios sobre la racemización de alcoholes secundarios y  $\alpha$ -hidroxicarbonilos,<sup>206-208</sup> tipo aciloína o benzoína, catalizada por bacterias, hongos y levaduras, comprobando que la racemización se produce a través de un proceso de oxidación-reducción, con la formación del correspondiente intermedio carbonílico o dicarbonílico (Esquema 19).



**Esquema 19.** Racemización de 1,2-diaril-2-hidroxiacetonas.

#### 1.2.1.4. Aplicaciones de glicosidasas en química orgánica

Las glicosidasas están muy extendidas en la naturaleza y es relativamente sencillo acceder a ellas, en la actualidad se conocen cerca de 2.500 de estas enzimas.<sup>209</sup> La oferta comercial de las glicosidasas por parte de laboratorios japoneses, europeos y americanos se ha incrementado enormemente debido a gran número de aplicaciones y a su bajo precio. La aplicación más importante de las glicosidasas en química orgánica es la síntesis de oligosacáridos.

##### 1.2.1.4.1. Síntesis enzimática de oligosacáridos con glicosidasas

Se sabe que, en la vía hidrolítica el agua actúa como nucleófilo y que es posible reemplazarla por otros nucleófilos, como pueden ser otros glicósidos o un alcohol no natural. Hay dos aproximaciones al mecanismo por el cual esta enzima puede llevar a la síntesis de glicósidos:

1. La aproximación termodinámica, que es directamente la inversa a la hidrólisis y en la que el equilibrio es desplazado de la hidrólisis a la síntesis. Se emplean los sustratos libres y se ha referido a ella como “glicosilación directa” o “hidrólisis inversa”.
2. La segunda aproximación es la cinética, también conocida como “transglicosilación”, en la que se emplea glicósidos activados que se unen con un nucleófilo usando la glicosidasa apropiada. En este caso, como buenos donadores se usan los que posean buenos grupos salientes, como glicósidos con fluoruros, azida o *p*-nitrofenilo, entre otros. Una vez formado el producto de reacción puede ser hidrolizado por la enzima, pero este hecho dependerá de que la transglicosidación sea más rápida que la hidrólisis y que la hidrólisis del producto de reacción sea más lenta que la del donador.

Sin embargo, la síntesis enzimática de oligosacáridos con el empleo de glicosidasas también posee desventajas, como por ejemplo los bajos rendimientos de reacción, por ello, es

necesario evaluar los diferentes factores de reacción para llevar a cabo una mejora en este tipo de reacciones:

- Enzima empleada: aunque las glicosidasas no son específicas del aceptor, si que poseen una cierta selectividad, dependiendo de la enzima con la que trabajemos, lo cual no permite llegar a unos productos determinados.<sup>210</sup>
- Concentraciones empleadas donador/aceptor: empleando una mayor concentración de aceptor que de donador, el equilibrio se ve desplazado hacia la síntesis de producto, en vez de hacia la hidrólisis.<sup>211-213</sup>
- Medio de reacción: cada enzima tiene un medio de reacción y una temperatura óptima de trabajo, los cuales son importantes para tener el mejor rendimiento de la enzima. Además la adición de co-solventes disminuyendo la cantidad de agua en la reacción, puede reducir la proporción de hidrólisis producida en la formación de oligosacáridos.<sup>214, 215</sup>

#### 1.2.1.4.2. Síntesis enzimática de oligosacáridos con galactosidasas

Las galactosidasas son exo-glicosidasas cuya función es la de hidrolizar el enlace *O*-glicosídico de residuos de galactosa terminales. Pertenecen al grupo E.C. 3.2.1.23, y han sido objeto de muchos estudios en los últimos años.<sup>91, 92, 216</sup>

Las  $\beta$ -galactosidasas han sido utilizadas ampliamente en la síntesis de oligosacáridos y glicoconjugados. La estereoselectividad de estos biocatalizadores es marcadamente superior a la de la síntesis química, sin embargo, la regioselectividad de los procesos no es absolutamente predecible ya que en muchos casos se producen mezclas de isómeros.

Por ejemplo, la  $\beta$ -galactosidasa de *Escherichia coli* presenta una elevada selectividad hacia la formación del enlace *O*-glicosídico  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6),<sup>90, 217, 218</sup> pero si el aceptor utilizado es la D-xilosa, donde no existe el hidroxilo en posición 6, la glicosidación se produce mayoritariamente en la posición  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). Por el contrario, cuando el aceptor es L-xilosa, el enlace  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), es ligeramente mayoritario a los enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) y  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 2).<sup>217</sup>

La  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* es una enzima que también presenta especificidad por la posición  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) mayoritariamente, pero también tienen la capacidad de formar enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) y  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3).<sup>90, 217-220</sup> Esta enzima ha sido ampliamente utilizada y con la que se ha demostrado que es posible trabajar con disolventes orgánicos obteniendo rendimientos elevados.<sup>221</sup>

La  $\beta$ -galactosidasa de *Sulfolobus solfataricus*, es una enzima termoestable y también produce mayoritariamente  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6), aunque también se obtienen otros productos minoritarios  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) y  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4).<sup>213, 222</sup>

La  $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans* está disponible comercialmente y ha sido también muy utilizada en la síntesis de oligosacáridos o glicoconjugados formando mayoritariamente enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). En concreto ha sido muy empleada en la preparación de la

*N*-acetil-lactosamina (Gal- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-GlcNAc), disacárido que presenta gran interés biológico ya que forma parte de glicoproteínas y glicolípidos presentes en las membranas celulares.<sup>223</sup> A pesar de la elevada regioselectividad presentada por esta enzima, se ha detectado también la formación de enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6).<sup>209, 224-227</sup> En los últimos años se ha estudiado el potencial sintético de este biocatalizador y cómo afectan diferentes tipos de sustratos donador o aceptor a la regioselectividad y al rendimiento del proceso. Citaremos que determinados *N*-acetil derivados de glucosa o galactosa como aceptor, no induce la formación de enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) ni  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 1) y sí de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) y  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6); metil derivados del aceptor también induce la formación del enlace  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) y sin embargo, con aceptores tipo 3-acetamido-3-desoxiglucosa, los enlaces *O*-glicosídicos formados son  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) y  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 1).<sup>225</sup>

La  $\beta$ -galactosidasa *Kluyveromyces lactis* es capaz de hidrolizar la lactosa que presenta enlace *O*-glicosídico del tipo  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). Por su potencial para realizar procesos biotecnológicos se han realizado estudios en los que se establecen las condiciones óptimas de temperatura, pH y concentración iónica del medio tanto para la estabilidad de estas enzimas como para la actividad enzimática.<sup>217, 228</sup>

La  $\beta$ -galactosidasa de testículo de toro es capaz de producir hetero-oligosacáridos unidos por enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3). Este biocatalizador transfiere una unidad de galactosa a residuos que contengan derivados de glucosa o galactosa estableciendo uniones  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3). Esta  $\beta$ -galactosidasa es mesófila y su disponibilidad comercial es limitada, de ahí que en la mayoría de las publicaciones relacionadas con esta enzima se emplean extractos enzimáticos aislados directamente de la fuente natural.<sup>217, 229-233</sup>

En los últimos años, la necesidad de llevar a cabo un escalado industrial de los procesos de síntesis de oligosacáridos y glicoconjugados, ha llevado a la búsqueda de nuevas actividades  $\beta$ -galactosidasa en microorganismos termófilos o extremófilos, mediante ingeniería genética, creándose nuevas bibliotecas de enzimas termófilas recombinantes.<sup>234</sup>

### 1.2.2. Inmovilización de enzimas.

La inmovilización enzimática es el proceso por el que se confina o se localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas repetidamente.<sup>235</sup> Posteriormente, esta definición se amplió a aquel proceso por el cual se restringen, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de enzimas, orgánulos, células, etc., por su unión a un soporte o por confinamiento físico dentro de una matriz.<sup>31</sup>

Además de aumentar la estabilidad, selectividad y actividad enzimática, y permitir su reutilización, la inmovilización de enzimas proporciona otra serie de ventajas:<sup>75</sup>

- Facilita el manejo de las enzimas y permite separarlas fácilmente del producto, minimizando o eliminando la contaminación proteica del producto final.

- Permite simplificar el diseño de los reactores y el control de la reacción.
- Permite el desarrollo de procesos multienzimáticos.
- Disminuye la inhibición por sustrato, producto u otros compuestos que se encuentren en el medio.

Frente a estas ventajas, también los biocatalizadores inmovilizados pueden presentar algunos inconvenientes como: <sup>29</sup>

- La alteración de la conformación de la enzima respecto a su estado nativo.
- La gran heterogeneidad del sistema enzima-soporte, ya que puede haber distintas fracciones de enzima inmovilizada con diferente número de puntos de unión al soporte, o diferente contenido enzimático en cada fracción de derivado.
- Se puede producir una pérdida de actividad durante el proceso de inmovilización.
- Pueden presentarse problemas de difusión a través del derivado, de forma que sólo una pequeña proporción del sustrato llegue hasta la enzima.

En resumen, los principales efectos que un proceso de inmovilización puede ocasionar sobre el biocatalizador son los siguientes: <sup>33, 75</sup>

1. Efectos en la estabilidad: la inmovilización de enzimas en el interior de estructuras porosas permite una mayor dispersión de las moléculas enzimáticas, previniendo su interacción, agregación y lisis, y evitando el contacto con interfases hidrofóbicas externas que puedan provocar la inactivación enzimática.

Mediante la inmovilización covalente multipuntual de enzimas, la estructura terciaria de la proteína adquiere una mayor rigidez debido a la presencia de múltiples puntos de unión enzima-soporte. Por tanto, se disminuye la posibilidad de que la enzima sufra un cambio conformacional provocado por otro agente como el calor, pH, disolventes orgánicos, etc.

Además se produce una alteración del microentorno enzimático, debido a la interacción de la enzima con el soporte. En algunos casos, el soporte tiene un efecto tamponador del medio, protegiendo a la enzima de cambios de pH, y en otros, la hidrofilia del soporte o su capacidad para retener agua, regula la actividad de la enzima.

También mediante técnicas de inmovilización se puede aumentar la estabilidad de enzimas multiméricas, evitando la disociación de la enzima en subunidades.

2. Efectos en la actividad enzimática: la actividad catalítica de la enzima debe conservarse después del proceso de inmovilización. En algunos casos, puede disminuir o incluso desaparecer, por ejemplo, si la unión al soporte se hace a través de los residuos del centro activo, o si se produce una distorsión del centro activo, de forma que el paso del sustrato al mismo esté impedido.

Algunas enzimas presentan dos formas con una actividad muy diferente; si durante el proceso de inmovilización se fija aquella de mayor actividad, el derivado obtenido presentará mayor actividad que la enzima nativa. Tal es el caso de las lipasas. La mayoría de las lipasas

presentan un fenómeno denominado *activación interfacial*, de forma que la mayor actividad catalítica se observa sólo en presencia de una interfase hidrofóbica.<sup>236, 237</sup> Se ha demostrado que la inmovilización de lipasas en soportes hidrofóbicos<sup>238-240</sup> o en presencia de detergentes,<sup>241-243</sup> provoca el desplazamiento del equilibrio entre las dos conformaciones hacia la conformación abierta o activa, permitiendo obtener derivados hiperactivados, de gran utilidad en la conversión de sustratos hidrofóbicos.

3. Efectos en la selectividad de la enzima: como ya se ha comentado, la inmovilización puede provocar una distorsión del centro activo, y le confiere una rigidez a la enzima que puede alterar sus propiedades, pudiendo modular su enantiopreferencia.<sup>244, 245</sup>

#### **1.2.2.1. Métodos de inmovilización de enzimas**

Existen numerosos y muy diversos métodos de inmovilización de enzimas.<sup>33-35</sup> En general, los métodos de inmovilización se suelen clasificar en dos grandes categorías: retención física (A) y unión química (B).

##### **A. Métodos de inmovilización enzimática por retención física:**

A.1. Atrapamiento: consiste en la retención física de la enzima en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa, creando una barrera alrededor de la enzima permeable al sustrato y producto, pero impermeable al biocatalizador. El proceso se lleva a cabo mediante la suspensión de la enzima en una solución del monómero y a continuación se inicia la polimerización por un cambio de temperatura o por la adición de un reactivo químico. El atrapamiento puede ser en geles o en fibras. En el primer caso, la enzima queda atrapada en el interior de un gel, y en el segundo caso, se encuentra ocluida dentro de las microcavidades de una fibra sintética. Es un procedimiento sencillo y la enzima no sufre ninguna alteración en su estructura si se realiza un riguroso control de las condiciones de polimerización. Esta metodología ha sido aplicada con gran éxito en la inmovilización de lipasas en una matriz sol-gel, formada por la polimerización hidrolítica de alcóxidos metálicos.<sup>246</sup>

##### A.2. Inclusión en membranas:

A.2.1. Microencapsulación: en este proceso las enzimas quedan rodeadas de membranas semipermeables que permiten el paso de sustrato y producto pero no del biocatalizador, formando unas microcápsulas esféricas de tamaño comprendido entre 1 y 100  $\mu\text{m}$  de diámetro.

A.2.2. Reactores de membrana: emplean membranas permeables al producto, permeables o no al sustrato, e impermeables a la enzima. Mediante una bomba se establece un flujo líquido de sustrato que atraviesa el reactor. En general, en esta metodología se realiza previamente la adsorción de la enzima sobre la membrana.

## B. Métodos de inmovilización enzimática por unión química:

### B.1. Unión a soportes:

B.1.1. Adsorción: la enzima se une al soporte mediante interacciones iónicas, de Van der Waals y por puentes de hidrógeno. Es un método de sencilla preparación y bajo coste, pero en general son poco estables desde el punto de vista mecánico y la unión enzima-soporte es débil.

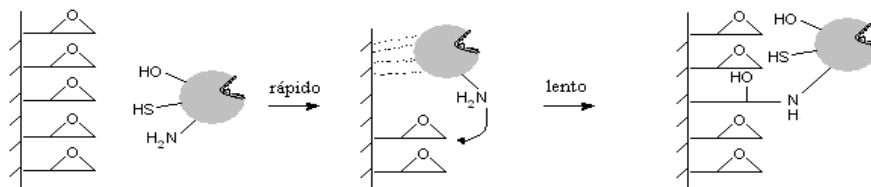
B.1.2. Unión covalente: esta metodología se basa en la activación de grupos químicos del soporte, que reaccionarán con residuos nucleófilos de la proteína enzimática, principalmente cisteína, lisina, histidina y tirosina, formando una unión muy estable enzima-soporte. En general, la manipulación de estos derivados es muy sencilla, y proporcionan al biocatalizador una mayor resistencia y estabilidad frente a elevadas temperaturas, disolventes orgánicos y pH del medio. Sin embargo, hay que tener en cuenta que para llevar a cabo este proceso es necesario conocer la densidad de grupos activos por unidad de superficie, ya que condiciona el número de uniones enzima-soporte y su geometría, que puede distorsionar inadecuadamente a la enzima y conducir a derivados inactivos.

Se han descrito muchos protocolos de inmovilización covalente de proteínas,<sup>26-28, 30, 32, 223, 247</sup> sin embargo, muchos de estos protocolos presentan deficiencias cuando se trata de inmovilizar la enzima cuantitativamente, trabajar en condiciones experimentales suaves, emplear grandes cantidades de enzima por miligramo de soporte o a la hora de conferir una elevada estabilidad a los derivados inmovilizados para facilitar su manipulación (por ejemplo, cuando la inmovilización se lleva a cabo a escala industrial). Por esto, no existen muchas metodologías fácilmente aplicables, que puedan ser empleadas para inmovilizar grandes cantidades de enzima en cualquier soporte empleando condiciones experimentales suaves.

Los soportes funcionalizados con grupos epóxido podrían ser los sistemas ideales para desarrollar protocolos sencillos para la inmovilización de enzimas.<sup>247-249</sup> Los grupos epóxido son estables a valores de pH neutro incluso en condiciones de humedad, por esto los soportes comerciales pueden ser almacenados durante largos periodos de tiempo y ser sintetizados a grandes distancias del lugar donde van a ser inmovilizadas las enzimas. Además, estos soportes pueden ser empleados para estabilizar enzimas mediante el anclaje covalente multipuntual controlando las interacciones entre enzima y soporte.<sup>250, 251</sup> Estos soportes son capaces de reaccionar con grupos nucleófilos de la superficie de la enzima (amino, hidroxilo, tiol), dando lugar a la formación de enlaces de elevada fortaleza (enlaces amino, éter o tío éter) con modificaciones químicas mínimas en la proteína.

Una vez finalizada la inmovilización, los grupos epóxido que no hayan reaccionado con la enzima pueden ser bloqueados fácilmente mediante reacción con diferentes compuestos tiol ó amino bajo condiciones suaves,<sup>252</sup> previniendo de esta forma reacciones incontroladas entre el soporte y la enzima inmovilizada que podrían originar un descenso en la estabilidad de la enzima.

El proceso de inmovilización en soportes funcionalizados con grupos epóxido ocurre a través de un mecanismo que consta de dos etapas (Figura 5): primero una rápida adsorción física y posteriormente un lento anclaje covalente entre los grupos nucleófilos de la enzima y los grupos epóxido del soporte.<sup>30, 253, 254</sup>



**Figura 5.** Proceso de inmovilización enzimática.

La interacción covalente entre la enzima soluble y el soporte funcionalizado con grupos epóxido es extremadamente lenta, de hecho, los grupos epóxido son poco reactivos para la inmovilización de enzimas en condiciones suaves (pH neutro y baja fuerza iónica del medio de inmovilización).<sup>30, 253-255</sup> Sin embargo, el anclaje covalente de enzimas que han sido previamente adsorbidas físicamente ocurre a una mayor velocidad, ya que se trata de una reacción intramolecular.

B.2. **Reticulado:** también denominado entrecruzamiento o *cross-linking enzymes* (CLEs), consiste en la utilización de reactivos bifuncionales, como dialdehídos, que originan uniones intermoleculares entre las moléculas de enzima. Uno de los métodos más utilizados consiste en la cristalización de enzimas y su posterior reticulado con glutaraldehído (*cross-linking enzyme crystals* o *CLECs*). Se obtiene un entramado cristalino, que pueden soportar elevadas temperaturas y pH extremos. Una variante que no requiere la utilización de enzimas cristalinas, son los denominados *cross-linking enzyme aggregates* o *CLEAs*, metodología que combina una simple purificación de la proteína por precipitación por adición de sulfato amónico o polietilenglicol y la inmovilización.

Aunque se han desarrollado y aplicado muchas técnicas de inmovilización a numerosos enzimas, se reconoce que no existe un método universal válido para todos los enzimas en todos los casos. No obstante, gracias a toda la información disponible en la actualidad, se pueden hacer generalizaciones sobre cada método de inmovilización y así, podremos seleccionar el más adecuado para cada aplicación específica. La elección ha de tener en cuenta las condiciones de la reacción biocatalizada, el tipo de reactor que se vaya a utilizar, el tipo de sustrato que tenga que ser procesado y otros factores.

#### 1.2.2.2. Soportes para la inmovilización de enzimas.

La elección del soporte y del tipo de unión enzima-soporte resultan determinantes en el comportamiento posterior del biocatalizador. El soporte debe tener resistencia mecánica adecuada a las condiciones de operación del reactor y ser fácilmente separable del medio líquido

para ser reutilizado. Se han utilizado gran variedad de materiales como soportes, destacando entre ellos:

- polímeros orgánicos sintéticos, como poliolefinas y polímeros acrílicos como Eupergit<sup>®</sup>C,<sup>249, 256</sup> y Sepabeads<sup>251</sup> ampliamente utilizados. En este grupo se englobarían los denominados “polímeros inteligentes”, unidos covalentemente a la enzima y que sufren cambios conformacionales en función de las condiciones del medio, como poli-N-isopropilacrilamida (polyNIPAM),<sup>257</sup> soluble en agua por debajo de 32 °C. La reacción enzimática se puede llevar a cabo por debajo de esta temperatura, siendo la enzima soluble, y a continuación, aumentando la temperatura se produciría la precipitación del derivado, facilitando su aislamiento.
- Biopolímeros, normalmente polisacáridos insolubles en agua como celulosa,<sup>258, 259</sup> agarosa,<sup>260-262</sup> quitosano,<sup>263-265</sup> proteínas fibrosas como colágeno<sup>266, 267</sup> ó queratina.<sup>268, 269</sup>
- Hidrogeles,<sup>270-272</sup> como el alcohol polivinílico (PVA).<sup>273-275</sup>
- Soportes inorgánicos, como alúmina,<sup>276, 277</sup> sílica,<sup>278, 279</sup> zeolitas,<sup>280-282</sup> CPG (“controlled pore glasses”).<sup>283-285</sup>

### 1.2.2.3. Aplicaciones de las enzimas inmovilizadas.

Las aplicaciones más importantes de las enzimas inmovilizadas se pueden clasificar en:

1. Aplicaciones analíticas: biosensores.
2. Aplicaciones médicas: tratamientos con enzimas inmovilizadas.
3. Aplicaciones industriales: en la industria química, farmacéutica, alimentaria y de tratamiento de residuos.

#### 1. Biosensores

Los biosensores se están convirtiendo en una herramienta imprescindible en medicina, en el control de calidad de los alimentos y en el control medioambiental. En principio, se puede diseñar un biosensor para cualquier tipo de compuesto que sea capaz de interactuar específicamente con un sistema biológico. Generalmente, el biosensor contiene una molécula biológica inmovilizada (enzimas, células, anticuerpos) próxima a un traductor que, en contacto con el analito, transformará la señal química producida en una señal eléctrica o de otro tipo (óptica, calorimétrica, acústica, etc.).<sup>286</sup>

El empleo de los biosensores presenta las siguientes ventajas:

1. La instrumentación requerida es barata y sencilla,
2. El análisis es muy sensible,
3. Permite el uso de muestras con color o turbias que no se podrían medir con métodos espectroscópicos.

Los métodos de inmovilización más utilizados en el diseño de biosensores son la inclusión en membranas semipermeables y la unión covalente a membranas. En ambos casos, las enzimas inmovilizadas van adheridas a la superficie sensible del electrodo.<sup>287</sup>



Los biosensores poseen diversas aplicaciones. Por ejemplo, son de gran utilidad en el campo del diagnóstico clínico. Los niveles séricos de glucosa, lactato y ácido úrico se pueden detectar mediante electrodos enzimáticos disponibles comercialmente. Actualmente, el desarrollo de nuevos biosensores va dirigido a la detección de fármacos, células y virus patógenos. En el caso del control de calidad en las industrias alimentarias, los biosensores pueden determinar el grado de contaminación microbiana, o por ejemplo, cuantificar el azúcar presente en bebidas. Finalmente, los biosensores pueden ser muy útiles en el control de la polución del medioambiente. Los analizadores de contaminantes en el agua se basan en el empleo de biosensores capaces de detectar la presencia de residuos tóxicos, pesticidas, herbicidas o microorganismos.

## 2. Aplicaciones médicas

Existen muchas enfermedades causadas por una alteración o carencia de una determinada enzima. También hay enzimas con actividad antitumoral, cicatrizante y con otras acciones terapéuticas. El tratamiento con estas enzimas inmovilizadas permitiría una acción más prolongada, ya que serían más resistentes a la acción de las proteasas. Por ejemplo, la L-asparaginasa se utiliza en el tratamiento de leucemias y cánceres diseminados que requieren asparagina para desarrollarse. En la actualidad se ha diseñado un hemodializador de fibra hueca que contiene asparaginasa inmovilizada.<sup>288</sup> La tripsina o la colagenasa se utilizan para eliminar los tejidos muertos de heridas, quemaduras, úlceras, etc.; para acelerar el crecimiento de nuevos tejidos e injertos de piel, y también para inhibir el crecimiento de algunos microorganismos contaminantes. Este tipo de enzimas se pueden inmovilizar en celulosas o fibras que formarán parte del tejido de apósitos y vendas.<sup>289</sup>

## 3. Aplicaciones industriales

### *3.1. Aplicaciones en la Industria Farmacéutica*

Generalmente, la Industria Farmacéutica trabaja con moléculas lábiles, y en muchos casos con moléculas quirales. El empleo de enzimas inmovilizadas es una buena alternativa en ciertos pasos de la síntesis química, donde no conviene trabajar a temperaturas altas o se requiere una elevada especificidad de sustrato. Los enzimas son unos reactivos quirales estrictos, es decir, biocatalizadores con una estructura tridimensional asimétrica definida que permiten la obtención de productos de gran pureza óptica. Se trata de una ventaja fundamental cuando las reglamentaciones exigen la síntesis de compuestos ópticamente puros, ya sean fármacos, hormonas o antibióticos. En esta aplicación se puede destacar la obtención de antibióticos  $\beta$ -lactámicos<sup>32, 290</sup> y la obtención de fármacos ópticamente puros.<sup>291-295</sup>

### *3.2. Aplicaciones en la Industria Alimentaria*

Son muchas las enzimas que se emplean en el procesado, la preparación y la conservación de los alimentos. Normalmente, las enzimas solubles añadidas son inactivadas por calentamiento una vez que el tratamiento ha concluido. En ocasiones se permite que continúe su

actividad para que los alimentos desarrollen el aroma y la textura deseados, pero nunca se reutilizan. La inmovilización permite que las enzimas puedan ser reutilizadas repetidamente en operaciones continuas o discontinuas. De todas maneras, existen limitaciones a su empleo relacionadas con los requisitos económicos y sanitarios inherentes al procesado de alimentos.<sup>296</sup>

Dentro de las aplicaciones conocidas de las enzimas inmovilizadas en la industria alimentaria se pueden enumerar: la hidrólisis de proteínas<sup>32, 297</sup> hidrólisis de hidratos de carbono,<sup>298-300</sup> mejora de las características organolépticas de ciertos alimentos,<sup>32, 301</sup> obtención de edulcorantes y aditivos alimentarios,<sup>32</sup> etc.

### 3.3. Aplicaciones en la Industria Química

Un ejemplo lo protagoniza la obtención industrial de acrilamida, compuesto ampliamente utilizado en la preparación de diferentes polímeros, aditivos y en el tratamiento del petróleo. Para ello se emplean células de *R. rhodochrous* inmovilizadas en un gel de poli(acrilamida). Este microorganismo es rico en nitrilo hidratasa,<sup>302</sup> una enzima que es capaz de convertir el acrilonitrilo en acrilamida.

La obtención de productos de alto valor añadido es también un campo importante para la síntesis catalizada por enzimas inmovilizadas. Como ejemplos podríamos citar la síntesis de péptidos, fragancias e insecticidas.

### 3.4. Tratamientos de aguas residuales

También se ha desarrollado un método para la reducción de nitratos a nitritos en aguas residuales que emplea enzimas inmovilizadas.<sup>303</sup> El benceno es otro compuesto muy tóxico que puede ser degradado mediante células de *Pseudomonas putida* atrapadas en geles de poli(acrilamida).<sup>304</sup>

## 1.3. Química Sostenible (Green Chemistry)

A principios de los años noventa, apareció un nuevo campo de investigación y desarrollo con el objetivo de disminuir el impacto sobre la salud y el medio ambiente en los procesos industriales y de investigación.<sup>305</sup> Este campo se denominó “Química Sostenible”<sup>306-311</sup> y lo podemos definir como **“la utilización de un conjunto de principios que reducen o eliminan el uso y generación de sustancias peligrosas en el diseño, manufactura y aplicación de productos químicos”**.

En la lucha por proteger el planeta, el gobierno de la Unión Europea ha acordado un tratado denominado REACH, que es la nueva legislación relativa a los procesos químicos y a su uso seguro. El objeto de dicha legislación es el registro, la evaluación y la autorización de sustancias y preparados químicos (<http://www.ec.europa.eu/environment/seveso/index.htm>). La química verde es difundida a través de la industria química e incluye el uso y desarrollo de nuevas sustancias y procesos de impacto en sectores como la agricultura, la salud, la ingeniería aeroespacial, la automovilística, la energética, electrónica y materiales avanzados.

### 1.3.1. Los doce principios de la química sostenible

El diseño de productos y procesos medioambientalmente benignos debe guiarse con los 12 principios de la química sostenible desarrollados por P. Anastas y J. C. Warner,<sup>307</sup> que se basan en reducir riesgos y minimizar la huella medioambiental, y son:

1. **Prevención:** es preferible evitar la producción de un residuo que tratarlo o limpiarlo una vez que se haya formado.
2. **Economía atómica:** los métodos de síntesis deberán diseñarse de manera que incorporen al máximo, en el producto final, todos los materiales usados durante el proceso.
3. **Usar metodologías que generen productos con toxicidad reducida:** siempre que sea posible, los métodos de síntesis deberán diseñarse para utilizar y generar sustancias que tengan poca o ninguna toxicidad, tanto para el hombre como para el ambiente.
4. **Generar productos eficaces pero no tóxicos:** los productos químicos deberían ser diseñados de manera que mantengan su eficacia a la vez que reduzcan su toxicidad.
5. **Reducir el uso de sustancias auxiliares:** se evitará, en lo posible, el uso de sustancias auxiliares (disolventes, reactivos de separación, etc.) y en el caso de que se utilicen que sean lo más inocuos posible.
6. **Disminuir el consumo energético:** los requerimientos energéticos serán catalogados por su impacto medioambiental y económico, reduciéndose todo lo posible. Se intentará llevar a cabo los métodos de síntesis a temperatura y presión ambientes.
7. **Utilizar de materias primas renovables:** la materia prima ha de ser preferiblemente renovable en vez de agotable, siempre que sea técnica y económicamente viable.
8. **Evitar la derivatización innecesaria:** se evitará en lo posible la formación de derivados (grupos de bloqueo, de protección/desprotección, modificación temporal de procesos físicos/químicos).
9. **Enfatizar en el uso de catálisis:** se emplearán catalizadores (lo más selectivos posible) en vez de reactivos estequiométricos.
10. **Generar productos biodegradables:** los productos químicos se diseñarán de tal manera que al finalizar su función no persistan en el medio ambiente sino que se transformen en productos de degradación inocuos.
11. **Desarrollar metodologías analíticas para la monitorización en tiempo real:** para las metodologías analíticas serán desarrolladas posteriormente para permitir una monitorización y control en tiempo real del proceso, previo a la formación de sustancias peligrosas.
12. **Minimizar el potencial de accidentes:** se elegirán las sustancias empleadas en los procesos químicos de forma que se minimice el riesgo potencial de accidentes químicos, incluidas emanaciones, explosiones e incendios.

En el desarrollo de la química verde dos puntos han sido significativos, por un lado, el uso de biocatalizadores, empleando células enteras y enzimas en sustitución de los tradicionales catalizadores en la química orgánica clásica,<sup>2</sup> y por otro lado, el empleo de nuevos disolventes, como son los denominados disolventes sostenibles que se encuentra en pleno desarrollo.

### **1.3.2. Disolventes sostenibles (Disolventes verdes)**

Los disolventes están presentes en casi todas las reacciones químicas, dicha dependencia viene dada porque con su empleo podemos controlar la temperatura, ayudar al transporte de materia durante el transcurso de la reacción y posteriormente facilitar la separación de diferentes sustancias químicas. Sin embargo, estos disolventes debido a los residuos que generan se encuentran implicados en procesos nocivos para el medioambiente tales como la formación de smog (contaminación atmosférica), el calentamiento global y el agotamiento de la capa de ozono. Además de los riesgos relacionados con la salud como su carácter inflamable, cancerígeno, tóxico, mutagénico y precursor de varias enfermedades.<sup>305</sup>

En los **12 principios de la química sostenible** se puede observar el disolvente como un elemento presente en la mayoría de ellos, de manera directa o indirecta, ya que los disolventes son imprescindibles tanto en la reacción química como en los procesos necesarios para el aislamiento y la purificación de los productos. En ocasiones el empleo de disolventes orgánicos es inevitable, debido a los beneficios que su uso nos reporta, sin embargo, en los últimos años se ha llevado a cabo un gran desarrollo en la búsqueda de nuevos disolventes, denominados disolventes sostenibles, los cuales tienen un menor impacto sobre el medio ambiente y la salud.

La cuestión es cómo de sostenible es un disolvente y que requisitos debe cumplir para considerarse como tal.<sup>312, 313</sup> No debe ser inflamable, ni tóxico, ni cancerígeno y no debe participar en ninguno de los procesos dañinos para el medioambiente tales como la formación de smog, el calentamiento global o la destrucción de la capa de ozono pero también debe cumplir unos requisitos en su proceso de obtención, tales como ser económico, no requerir una gran energía durante su producción y su materia prima no debe ser el petróleo, pudiendo ser derivados de materias primas renovables, como la biomasa. Cada disolvente sostenible es diferente, siendo unos más sostenibles que otros, depende de sus propiedades físicas ya que actúa sobre la actividad y la selectividad en el proceso de reacción, por ello, en cada caso concreto habría que elegir correctamente el disolvente. En el caso de su empleo en biocatálisis hay que tener en cuenta cómo afecta cada disolvente a las actividad y regio- y estereoselectividad de cada enzima, siendo maquinarias muy sensible a cualquier cambio.

### **1.3.3. Disolventes sostenibles y su utilización en biocatálisis**

En la actualidad, a pesar de que cada disolvente sostenible tenga unas características individuales los podemos agrupar en cinco tipos:

### 1.3.3.1. Agua.

El disolvente sostenible por excelencia es el agua, ya que es el empleado por la naturaleza para llevar a cabo sus reacciones.<sup>314</sup> En los últimos años se han descrito numerosas síntesis orgánicas empleando como disolvente el agua,<sup>315</sup> aunque en el campo donde ha sido mayormente empleado ha sido en el de la biocatálisis, debido a que las enzimas necesitan un cierto nivel de agua en su estructura para mantener su conformación natural y mantener por tanto su actividad catalítica.<sup>316</sup>

El agua posee una estructura y unas propiedades que le permiten ser utilizadas en la síntesis química o enzimática de compuestos de interés biológico o industrial. Dentro de estas propiedades podemos destacar el amplio rango de los numerosos enlaces de hidrógeno que pueden formar, alta capacidad de calentamiento, baja toxicidad, no inflamabilidad y por supuesto, baja peligrosidad. Sin embargo, también posee inconvenientes ya que los residuos después de su utilización son difíciles de eliminar y no todos los compuestos son solubles debido a su alta polaridad.

Para solucionar estos problemas este disolvente puede ser empleado en mezclas con otros disolventes,<sup>317</sup> los cuales amplían la solubilidad y llevan a una fácil separación pero no disminuimos el impacto medio ambiental. Sin embargo, su empleo como fluidos supercríticos (FSC) nos da numerosas ventajas ya que sus parámetros supercríticos son altos 374 °C y 221 bar, convirtiéndose en un fluido apolar debido a la pérdida de enlaces de hidrógeno en esas condiciones de reacción.<sup>318</sup>

### 1.3.3.2. Fluidos supercríticos (FSC).

El uso de FSC en reacciones catalizadas por enzimas en medios no acuosos fue descrito por primera vez hace veinte años<sup>319, 320</sup> y partir de entonces el uso de FSC en biocatálisis ha sido ampliamente estudiado, aumentando su empleo en los últimos años tanto a nivel industrial<sup>321</sup> como a nivel académico.<sup>322, 324</sup>

Un FSC se define como el estado de un compuesto o elemento por encima de su temperatura y presión críticas pero por debajo de la presión necesaria para condensarse en sólido.<sup>325-328</sup> Los FSC poseen las propiedades tanto de líquido como de gas, su densidad es comparable a la de los líquidos mientras que su viscosidad es comparable a la de los gases.<sup>328</sup> Los parámetros de FSC varían dependiendo de la sustancia particular de la que hablemos (Tabla 2).

Los FSC permiten un alto porcentaje de transferencia de masa por su alta difusibilidad y su baja viscosidad y son rápidamente eliminados después de la reacción por extracción. La solubilidad de un compuesto en FSC va a depender de la presión de vapor, la polaridad y el peso molecular del compuesto, siendo las condiciones adecuadas una alta presión de vapor, baja polaridad y bajo peso molecular.<sup>329</sup> Un punto importante en el empleo de FSC es la puesta a punto del medio, ya que pequeños cambios en la presión conducen a cambios significativos en

la densidad y las propiedades dependientes de ella.<sup>330</sup> Puesto que los cambios en las propiedades son predecibles, las reacciones en FSC pueden ser controladas de una manera racional.

**Tabla 2:** FSC utilizados en biocatálisis y sus parámetros críticos (<http://webbok.mist.gov>).

Sustancia	$T_c$ (°C)	$p_c$ (bar)
Dióxido de carbono (CO <sub>2</sub> )	31	73,8
Clorodifluorometano (ClF <sub>2</sub> CH)	-3,7	49,7
Etano (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> )	32,3	48,8
Eteno (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> )	9,2	50,5
Fluoroformo (CHF <sub>3</sub> )	26,2	48,5
Propano (C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> )	96,7	42,5
Agua (H <sub>2</sub> O)	374	221
Xenon (Xe)	17	5,8

El número de FSC empleados en reacciones catalizadas por enzimas es aún pequeño debido a la naturaleza de las proteínas, las cuales se desactivan con facilidad ante los cambios de temperaturas. El más empleado en biocatálisis es el CO<sub>2</sub> supercrítico (scCO<sub>2</sub>) debido a que es barato, inerte químicamente y no tóxico, por lo que se considera el FSC más verde y además sus parámetros críticos (31 °C y 73,8 bar) son compatibles con las condiciones necesarias en la mayoría de las reacciones enzimáticas. Varios tipos de enzimas como lipasas,<sup>331-333</sup> cutinasas<sup>334-335</sup> y  $\beta$ -galactosidasas<sup>336</sup> han sido probadas con este scCO<sub>2</sub>, y se han comportado de una manera estable, activa y enantioselectiva. Un ejemplo es el empleo de scCO<sub>2</sub> con la  $\beta$ -galactosidasa de *B. circulans* en la transglicosidación de *o*-nitrofenil- $\beta$ -galactopiranosido (*o*-NF- $\beta$ -Gal) con 5-fenilpentenol, obteniéndose un 72 % de rendimiento, siendo la reacción 15 veces más rápida que cuando se realiza en disolventes orgánicos convencionales.<sup>337</sup> También se han descrito varios casos de reacciones en presencia de scCO<sub>2</sub> utilizando lipasas inmovilizadas en diferentes superficies como son la celite, el sílica gel o el polipropileno,<sup>338-340</sup> el soporte hace más robusta a la enzima bajo tensión mecánica, incrementa la accesibilidad al centro activo y hace mucho más fácil su reciclado para la reutilización.

El scCO<sub>2</sub> es ampliamente utilizado pero en algunos casos la actividad enzimática se ve disminuida debido a la formación de carbamatos por reacción con los grupos amino de la enzima y a la formación de ácido carbónico formado al reaccionar el scCO<sub>2</sub> con el agua presente en la reacción.<sup>325-327</sup>

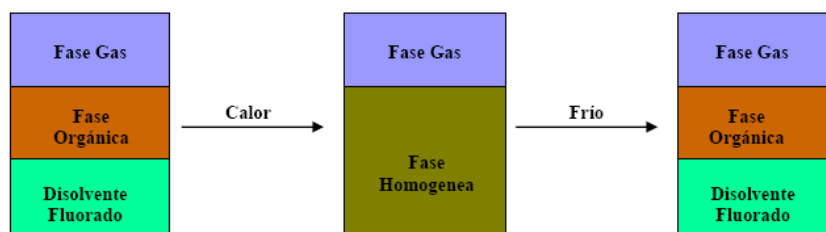
### 1.3.3.3. Disolventes fluorados (DF).

Los DF fueron descritos por primera vez por Horváth y Rábai,<sup>341</sup> y se emplean en una mezcla con un disolvente orgánico tradicional.<sup>342</sup> El término fluorado fue introducido porque son derivados perfluorados de alcanos, dietileter y trietilaminas, sus reacciones intermoleculares son muy débiles teniendo menor punto de ebullición y menor polaridad el disolvente fluorado que su correspondiente alcano (Tabla 3).

**Tabla 3:** Propiedades físicas de los DF empleados en biocatálisis.

Disolvente	Punto de ebullición (°C)	log P
Perfluorohexano (C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> )	57,1	6,65
Perfluoroheptane (C <sub>7</sub> F <sub>16</sub> )	82,4	6,54
Perfluorooctano (C <sub>8</sub> F <sub>18</sub> )	97-104	7,43
PFMC (CF <sub>3</sub> C <sub>6</sub> F <sub>11</sub> )	76,1	5,16
1,1,1,2,3,3,3,-heptafluoropropano (F <sub>3</sub> CCHF <sub>2</sub> CF <sub>3</sub> )	-16,4	1,74
Difluorometano (H <sub>2</sub> CF <sub>2</sub> )	-51,6	0,3

Los DF son poco polares, inertes químicamente, hidrofóbicos y no son tóxicos, sin embargo, a nivel industrial su empleo se encuentra limitado por el alto coste que suponen.<sup>325</sup> Su principal característica es su efecto termomórfico, ya que su miscibilidad con el disolvente orgánico depende de la temperatura (Figura 6). Por ello, se puede disolver los sustratos en un disolvente, siendo la mezcla con el otro disolvente un sistema heterogéneo a temperatura ambiente, aumentar la temperatura pasando a un sistema homogéneo para que se produzca la reacción en una sola fase y después enfriar para obtener de nuevo un sistema heterogéneo y facilitar la separación del producto y el medio de reacción.<sup>325, 343, 344</sup> Su solubilidad en agua es muy baja debido a la falta de enlaces de hidrógeno, mientras que en gases como CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> ó H<sub>2</sub> ó disolventes hidrofóbicos exhiben una mayor solubilidad (Tabla 4).

**Figura 6.** Efecto de la temperatura en al solubilidad de los DF.**Tabla 4:** Características físicas de diferentes sistemas de disolventes.

Sistema de disolventes (1:1)	Dos fases (°C)	Una fase (°C)
CF <sub>3</sub> C <sub>6</sub> F <sub>11</sub> /CCl <sub>4</sub>	TA	26,7
CF <sub>3</sub> C <sub>6</sub> F <sub>11</sub> /CHCl <sub>3</sub>	TA	50,1
CF <sub>3</sub> C <sub>6</sub> F <sub>11</sub> /hexano	0	TA
CF <sub>3</sub> C <sub>6</sub> F <sub>11</sub> /Et <sub>2</sub> O	0	TA
C <sub>6</sub> F <sub>14</sub> /C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	0	24

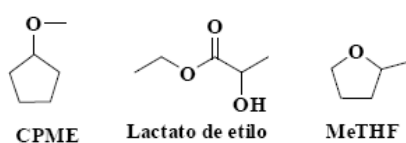
Desde el punto de vista sintético el efecto termomórfico es su propiedad más útil, habiendo sido empleado en catálisis,<sup>345, 346</sup> sin embargo, a pesar de que se han descrito varios ejemplos en biocatálisis, su empleo sigue siendo limitado, ya que las enzimas tienen una alta insolubilidad en los DF y las aptitudes de éstos como disolventes verdes están aun en entredicho.<sup>342</sup> Hasta la fecha, los mejores logros con este tipo de disolventes han sido su empleo como FSC, por ejemplo la utilización de la β-galactosidasa de *B. circulans* empleando

fluoroformo como disolvente, que ha sido empleada en la síntesis de 1-*O*-(5-fenilpentil)- $\beta$ -D-galactopiranosido con un rendimiento superior al 90 % a 37 °C en 5 horas.<sup>337</sup> Aunque sin duda donde más ejemplos encontramos es con las lipasas, con las que se han llevado a cabo reacciones de transesterificación en diferentes DF como son tetrafluoroetano ó fluoroformo. En los ejemplos descritos se obtienen altos excesos enantioméricos, del 99 % en presencia de estos disolventes, que son superiores a los obtenidos en disolventes convencionales.<sup>347</sup>

#### 1.3.3.4. Disolventes derivados de materias primas renovables.

La cuestión en este punto es qué disolventes deben ser empleados, sabiendo que el empleo de los co-solventes puede ayudarnos, habría que probar disolventes que además de proporcionarnos esa ayuda cumplan los **12 principios de la química verde**,<sup>307</sup> ya que los utilizados hasta el momento son perjudiciales para el medioambiente y la salud. Una opción es sustituir los disolventes orgánicos derivados del petróleo por otros procedentes de biomasa, los cuales son biodegradables, beneficiosos tanto para el medio ambiente como la salud y pueden ser obtenidos por procesos enzimáticos o fermentativos, que además gracias a las numerosos avances en manipulación genética, metabólica y enzimática se abren nuevas oportunidades para la producción de una amplia variedad de productos procedentes de fuentes naturales.<sup>348, 349</sup>

En la actualidad, las investigaciones en este campo se encuentran en pleno auge, en la búsqueda de los denominados “disolventes verdes”, tanto la industria como la investigación académica se encuentran embarcados en numerosos proyectos para su obtención y diversas aplicaciones ([www.solvsafe.org](http://www.solvsafe.org)). Algunos de ellos ya pueden ser obtenidos a nivel comercial como es el caso de lactado de etilo, el ciclopentenilmetileter (CPME) o el metiltetrahidrofurano (MeTHF) que son comercializados por varias empresas como Sigma-Aldrich o LOBA Chemie (Figura 7).



**Figura 7.** “Disolventes sostenibles” comercializados.

También encontramos en esta categoría el etanol, que responde a todas las características de un “disolvente verde”, desde su obtención de manera biológica hasta su fácil reciclado para su reutilización. Entre los disolventes procedentes de biomasa, además de los nombrados como es el caso del lactato de etilo podemos encontrar lactatos derivados de éste, terpeno como el D-limoneno y derivados, o ésteres de ácidos grasos. Especial mención merece el glicerol que se obtiene por transesterificación de triglicéridos en la producción de ácidos grasos naturales y posee una gran variedad estructural pudiendo llevar a cabo una modulación de sus propiedades como disolvente (Figura 8).<sup>350</sup> En estos momentos, podríamos decir que este campo de



investigación se encuentra en su nacimiento y las publicaciones realizadas con disolventes derivados de biomasa como medio en la biocatálisis son muy limitadas, aunque podemos encontrar algún ejemplo reciente de lipasas en MeTHF.<sup>351</sup>

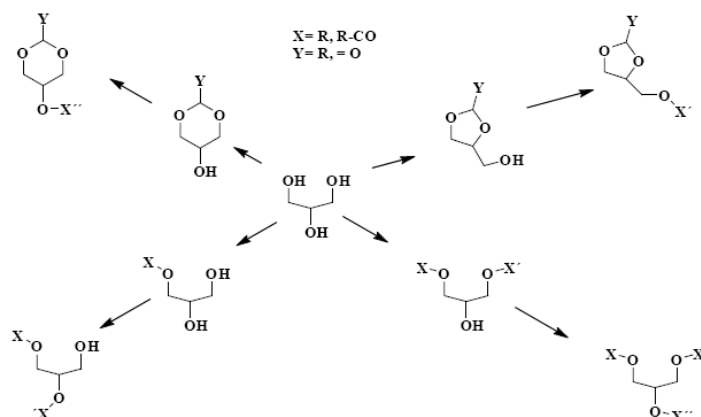


Figura 8. Posibles derivados del glicerol.<sup>350</sup>

### 1.3.3.5. Líquidos iónicos (LI).

Los líquidos iónicos (LI) son disolventes constituidos por iones, un catión orgánico y un anión inorgánico (Figura 9). La hidrofilia viene determinada principalmente por los aniones que puede ser fluorados ( $\text{BF}_4^-$  o  $\text{PF}_6^-$ ), alquilsulfatos o alquilsulfonatos ( $\text{RSO}_4^-$  o  $\text{RSO}_3^-$ ) o triflatos ( $\text{Tf}_2\text{N}^-$ ) pero también se puede ver influenciada por la longitud de cadena del catión. Por ejemplo,  $[\text{Bmim}][\text{BF}_4]$  es miscible en agua mientras que  $[\text{Bmim}][\text{PF}_6]$  es inmisible. Así mismo, la polaridad está relacionada con el tamaño del anión y aniones tales como nitritos, nitratos,  $\text{BF}_4^-$  y  $\text{PF}_6^-$  disminuyen la hidrofilia.<sup>352</sup>

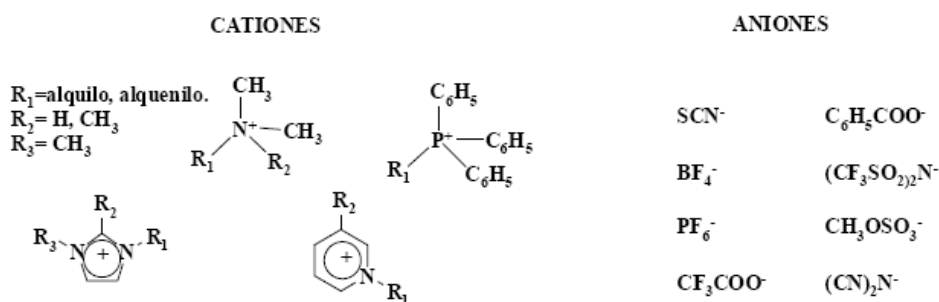


Figura 9. Estructura de los LI más empleados.

Los LI poseen una baja presión de vapor, no son inflamables, son estables térmica y químicamente y tienen un amplio rango de temperaturas en las que se encuentran en estado líquido, así como la oportunidad de ser reciclados y reutilizados de manera indefinida.<sup>353</sup> Sin duda, su propiedad más útil es el poder diseñar un disolvente con las propiedades químicas y físicas deseadas mediante la elección adecuada de los componentes, tanto catión como anión. Los LI son considerados “disolventes sostenibles” pero este hecho se encuentra en entredicho a la espera de más investigaciones, ya que no está claro cuáles de ellos entran dentro de esta categoría.<sup>354, 355</sup>

Los primeros experimentos de LI en el empleo de la biocatálisis mostraron que las enzimas poseían una estabilidad y actividad similares a cuando las enzimas se encuentran en presencia de disolventes orgánicos.<sup>356</sup> A partir de ahí, han sido numerosos los trabajos publicados en este campo.<sup>327, 353, 357-360</sup> Sin embargo, existen contradicciones en cómo estos disolventes afectan a las enzimas ya que los LI interaccionan con el agua disociándose en cationes y aniones modificando la actividad de agua, pudiendo afectar a la estabilidad y la actividad de la enzima.<sup>327</sup> En el caso de la regioselectividad, han sido descritos ejemplos en los que es mejorada con su presencia,<sup>361, 362</sup> en los que la enantioselectividad no se ve afectada<sup>363, 364</sup> e incluso alguno donde es reducida.<sup>365</sup> Numerosas enzimas han sido estudiadas catalizando reacciones en presencia de LI como es el caso de lipasas,<sup>366, 367</sup> proteasas,<sup>368, 369</sup> glicosidasas,<sup>370, 371</sup> oxidoreductasas<sup>372</sup> y células enteras.<sup>373</sup> Entre los ejemplos donde se utilizan glicosidasas en presencia de LI podemos citar la  $\beta$ -galactosidasa de *CelB* de *Pyrococcus furiosus*<sup>371</sup> en la síntesis de disacáridos en presencia de un 45 % de [Mmim]<sup>370</sup> mejora su actividad en la síntesis en casi un 20 %, mientras que con un 10 % de [Bmim][BF<sub>4</sub>] la actividad enzimática se inhibe, siendo esta diferencia de comportamiento explicado por la diferente naturaleza y combinación de los aniones que tiene lugar en la estabilización enzimática.<sup>374</sup> Otro ejemplo ha sido publicado por Kaftzik y col.<sup>370</sup> estos autores llevan a cabo la síntesis de *N*-lactosamina catalizada por la  $\beta$ -galactosidasa de *B. circulans* en presencia de un 25 % de [Mmim]<sup>370</sup> consiguiendo duplicar el rendimiento de la reacción con la presencia del LI.

## Capítulo II

# *Antecedentes*

---



## 2. ANTECEDENTES.

### 2.1. Síntesis de soportes poliméricos para la inmovilización de enzimas.

Durante las últimas décadas, han sido numerosos los grupos de investigación que han concentrado sus esfuerzos en la síntesis de polímeros, funcionalizados con grupos epóxido, con el objetivo de inmovilizar-estabilizar enzimas.<sup>255, 375-381</sup> Gracias a este continuado trabajo, hoy en día se pueden encontrar en el mercado diferentes polímeros comerciales, como por ejemplo soportes tipo Eupergit (de la empresa Rohm-Pharma), obtenidos por polimerización de N,N'-metilen-bis-metacrilamida), glicidil metacrilato, alil glicidil éter y metacrilato.<sup>249, 256</sup> Más recientemente se han puesto en el mercado soportes similares basados en polimetacrilato denominados Sepabeads (de la empresa Resindion S.L.).<sup>251</sup> Las principales ventajas de su utilización son: 1) aumento de estabilidad operacional del inmovilizado para uso continuo o discontinuo; 2) alta actividad por unidad de peso o volumen; 3) aumento del rendimiento referido a actividad; 4) no se requiere una activación del soporte.

Pese a la existencia de soportes comerciales funcionalizados con grupos epóxido, diversos grupos de investigación han persistido en la síntesis de polímeros funcionalizados con grupos epóxido con el objetivo de mejorar las propiedades que presentaban dichos soportes comerciales (carga enzimática, estabilidad operacional, etc.).<sup>382-387</sup>

Con el paso de los años, se han introducido diversas modificaciones a los soportes funcionalizados con grupos epóxido, surgiendo nuevos soportes multifuncionalizados,<sup>388-393</sup> cuya finalidad era, aumentar la velocidad de inmovilización de las enzimas al soporte, ya que los nuevos grupos que se introdujeron en dichos soportes promueven la adsorción física de las enzimas al soporte, y conseguir una orientación de la enzima en la aproximación física al soporte, originando diferentes grados de rigidez en la estructura de la enzima o incluso microambientes especiales que rodean a la enzima.<sup>394</sup> Estos factores pueden variar las propiedades catalíticas de determinadas enzimas.<sup>244, 395-398</sup>

### 2.2. Inmovilización-estabilización covalente de enzimas sobre soportes poliméricos funcionalizados con grupos epóxido.

Desde que se comenzara a trabajar en la inmovilización de enzimas a principio de los años sesenta,<sup>244, 394-401</sup> más de 10.000 publicaciones y patentes han sido publicadas en este campo.<sup>249</sup> Durante estos años, se ha realizado un progreso muy importante en la bioinmovilización de diferentes tipos de especies biológicas, y se han descrito numerosos materiales, técnicas y protocolos para la inmovilización de enzimas.

Sin embargo, los procedimientos utilizados en la inmovilización no han sido de uso general y sólo han resultado válidos para un limitado grupo de biomoléculas o de aplicaciones de éstas. Además, todos los problemas relacionados con la lixiviación o desorción de las

biomoléculas, la desnaturalización de éstas, así como la dificultad asociada con el control de la orientación de la biomolécula, conlleva la realización de un amplio trabajo de optimización del protocolo de inmovilización cada vez que se va a utilizar una nueva especie biológica.

Muchos de estos procedimientos de inmovilización-estabilización de enzimas se basan en la unión covalente enzima-soporte,<sup>26-28, 30, 32, 223, 247</sup> y han sido ampliamente utilizados con polímeros funcionalizados con grupos epóxido.<sup>249, 402-416</sup> Recientemente, con la aparición de nuevos soportes multifuncionalizados,<sup>30, 78-82, 247</sup> surgió la necesidad de desarrollar nuevos procedimientos de inmovilización-estabilización acordes a las modificaciones introducidas en los tradicionales soportes funcionalizados con grupos epóxido.<sup>30, 78-82, 247, 390, 391, 417</sup>

### 2.3. Inmovilización de diferentes enzimas y sus aplicaciones.

- **Inmovilización de  $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans* (Biolacta) y su aplicación en la síntesis de *N*-acetil-lactosamina.**

La  $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans* (Biolacta N° 5) ha sido ampliamente empleada en la síntesis de oligosacáridos o glicoconjugados formando mayoritariamente enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). En concreto ha sido muy utilizada en la preparación de la *N*-acetil-lactosamina (Gal- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-GlcNAc). A pesar de la elevada regioselectividad presentada por esta enzima, se ha detectado también la formación de enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6).<sup>217, 224-227</sup> En los últimos años se ha estudiado el potencial sintético de este biocatalizador y cómo afectan el proceso de inmovilización a la regioselectividad y al rendimiento del proceso.<sup>211, 212</sup>

- **Inmovilización de  $\beta$ -galactosidasa de *Escherichia coli* y su aplicación en la síntesis de *N*-acetil-lactosamina.**

La  $\beta$ -galactosidasa de *Escherichia coli* también ha sido muy empleada en la síntesis de oligosacáridos y glicoconjugados, presentando una elevada selectividad hacia la formación del enlace *O*-glicosídico  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6).<sup>90, 217, 218</sup> Cuando se utiliza como aceptor *N*-acetil-galactosamina (GalNAc), el derivado que se forma únicamente es el  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6). Recientemente se ha estudiado la influencia de diferentes disolventes sostenibles derivados del glicerol sobre esta enzima en la síntesis de *N*-acetil-lactosamina.<sup>418</sup> Todos estos trabajos de investigación se han llevado a cabo con la enzima libre, y por el momento no se ha descrito la inmovilización de esta enzima.

- **Inmovilización de  $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans*  $\beta$ -gal-3 ATCC 31382 y su aplicación en la síntesis de *N*-acetil-lactosamina.**

Esta enzima recombinante, producida por el Licenciado Carlos Bayón del grupo de Biotransformaciones de la Universidad Complutense de Madrid, está siendo eficientemente empleada en la síntesis de oligosacáridos (*N*-acetil-lactosamina  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)) y glicoconjugados. A su vez se está investigando la influencia de diferentes disolventes sostenibles sobre los rendimientos obtenidos y la regioselectividad de la enzima en la síntesis de diferentes

oligosacáridos. Hasta el momento no se ha descrito la inmovilización de esta enzima recombinante.

Varios son los trabajos de investigación en los que han empleado enzimas recombinantes semejante a esta enzima,<sup>419-425</sup> pero hasta el momento sólo se ha reportado un trabajo en el que se ha conseguido inmovilizar este tipo de enzimas.<sup>426</sup>

- **Inmovilización de  $\beta$ -galactosidasa de *Thermus thermophilus* TTP0042 y su aplicación en la síntesis de *N*-acetil-lactosamina.**

Esta enzima proporcionada por el Licenciado Manuel Sandoval del grupo de Biotransformaciones de la Universidad Complutense de Madrid, está siendo eficientemente empleada, por dicho grupo de Investigación, en la síntesis de oligosacáridos y glicoconjugados.<sup>427</sup> A su vez se está investigando la influencia de diferentes disolventes sostenibles sobre los rendimientos obtenidos y la regioselectividad de la enzima en la síntesis de diferentes oligosacáridos. Hasta el momento no se ha descrito la inmovilización de esta enzima.

- **Inmovilización de lipasa de *Pseudomonas fluorescens* y su aplicación en resoluciones cinéticas y resoluciones cinéticas dinámicas de alcoholes secundarios derivados del fenil etanol.**

La lipasa de *Pseudomonas fluorescens* ha sido previamente inmovilizada por diferentes grupos de investigación sobre diferentes soportes,<sup>426-436</sup> obteniéndose diferentes resultados. Los biocatalizadores obtenidos han sido empleados en diferentes procesos sintéticos, como son la síntesis de biodiesel, resoluciones cinéticas de diferentes alcoholes y ésteres, desprotección selectiva de azúcares, etc. Sin embargo, solo en algunos de ellos,<sup>431, 436</sup> han sido empleados en la resolución cinética de fenil etanol y sus derivados, mientras que hasta el momento no se ha reportado la resolución cinética dinámica del fenil etanol y sus derivados.

La resolución cinética y la resolución cinética dinámica del fenil etanol y sus derivados, catalizada por lipasas inmovilizadas, ha sido ampliamente utilizada por diversos grupos de investigación.<sup>436-462</sup> La mayoría de ellos han empleado la lipasa de *Candida antártica* B y la lipasa de *Pseudomonas cepacia*.

- **Inmovilización de lipasa de *Pseudomonas cepacia* y su aplicación en resoluciones cinéticas y resoluciones cinéticas dinámicas de alcoholes secundarios derivados del fenil etanol.**

La lipasa de *Pseudomonas cepacia* ha sido previamente inmovilizada por diferentes grupos de investigación sobre diferentes soportes,<sup>438, 445-448, 463-473</sup> obteniéndose diferentes resultados. Los biocatalizadores obtenidos han sido empleados en diferentes procesos sintéticos, como son la síntesis de biodiesel, resoluciones cinéticas de diferentes alcoholes y ésteres, desprotección selectiva de azúcares, etc. Numerosos son los artículos reportados sobre la resolución cinética y resolución cinética dinámica de fenil etanol y sus derivados empleando la lipasa de *Pseudomonas cepacia* inmovilizada.<sup>438, 444-448</sup>

- **Inmovilización de lipasa de *Pseudomonas stutzeri* y su aplicación en resoluciones cinéticas y resoluciones cinéticas dinámicas de alcoholes secundarios derivados del fenil etanol y 1,2-diaril-2-hidroxicetonas.**

La lipasa de *Pseudomonas stutzeri* únicamente ha sido inmovilizada por dos grupos de investigación.<sup>474, 475</sup> Uno de ellos, el grupo de investigación del Dr. Andrés R. Alcántara, empleó la enzima inmovilizada para la resolución cinética y resolución cinética dinámica de (*R, S*)-1,2-diaril-2-hidroxicetonas.<sup>474</sup> También emplearon la enzima libre en la resolución cinética y resolución cinética dinámica de diferentes (*R, S*)-1,2-diaril-2-hidroxicetonas.<sup>476-479</sup> Hasta el momento, ningún grupo de investigación ha descrito la resolución cinética, ni la resolución cinética dinámica de fenil etanoles y derivados empleando esta enzima.



## Capítulo III

---

# *Objetivos*

---



### 3. OBJETIVOS

1. Sintetizar una serie de monómeros (alquílicos, metacrílicos y arílicos) funcionalizados con diferente grado de epoxidación, de los que se preparan por primera vez : 2-alíl-1,3-diglicidil glicerol éter (**3**),  $\{2,2\text{-bis}[(\text{glicidiloxi})\text{metil}]\text{propil}\}$  metacrilato (**12**), triglicidil pentaeritritil metacrilato (**13**),  $p\text{-}\{2,2\text{-bis}[(\text{glicidiloxi})\text{metil}]\text{propanoxi}\}$  metil estireno (**17**) y  $p\text{-}[(\text{triglicidilpentaeritroxil})\text{metil}]$  estireno (**18**).
2. Obtención de nuevos soportes poliméricos, funcionalizados con grupos epóxido, que posean un tamaño de poro superior a 20 nm y la mayor superficie específica posible, llevando a cabo una serie de reacciones de polimerización en las que se variaran los siguientes de parámetros: porcentajes relativos de monómero / agente de entrecruzamiento, naturaleza del agente de entrecruzamiento, naturaleza y proporción del iniciador radicalario y rango de temperatura de polimerización.
3. Caracterización de los soportes poliméricos sintetizados, mediante distintas técnicas, que permita determinar cuáles de ellos son los más adecuados para llevar a cabo la inmovilización-estabilización de enzimas.
4. Preparación de nuevos biocatalizadores, que posean alta carga enzimática y elevada estabilidad operacional, mediante la inmovilización-estabilización de diferentes enzimas (glicosidasas y lipasas) sobre los soportes poliméricos sintetizados.
5. Aplicación de los diferentes biocatalizadores obtenidos, como metodología sostenible, en la síntesis regioselectiva de carbohidratos de interés biológico y, en la resolución cinética y cinética dinámica de diferentes alcoholes secundarios intermedios de productos con interés terapéutico.



## Capítulo IV

# *Plan de trabajo*



## 4. PLAN DE TRABAJO

El Plan de Trabajo desarrollado en esta Memoria implica:

- 4.1. Preparación de soportes poliméricos con ciertas propiedades texturales de tamaño de poro y superficie específica.
- 4.2. Caracterización de los soportes poliméricos sintetizados analizando su porosimetría y propiedades texturales.
- 4.3. Obtención de biocatalizadores, mediante la inmovilización-estabilización de enzimas sobre los soportes poliméricos seleccionados.
- 4.4. Aplicaciones de los biocatalizadores obtenidos en, la síntesis de *N*-acetil-lactosamina y la resolución cinética y resolución cinética dinámica de diferentes alcoholes secundarios.

### 4.1. Preparación de soportes poliméricos porosos.

La preparación de estos materiales implica, a su vez, las siguientes etapas:

- 4.1.1. Síntesis de monómeros.
- 4.1.2. Síntesis de agente de entrecruzamiento (crosslinker).
- 4.1.3. Reacciones de polimerización.

#### 4.1.1. Síntesis de monómeros.

Los monómeros deben tener restos insaturados (doble enlace), a través de los cuales se llevará a cabo las reacciones de polimerización, y restos oxirano (epóxido), como grupos funcionales de anclaje a la enzima.

Con el fin de obtener soportes poliméricos con distinto grado de hidrofiliidad, se han preparado tres tipos de monómeros:

##### 4.1.1.1. Síntesis de monómeros alquioxiranos.

Los derivados alquioxiranos preparados son estructuralmente referibles al alil glicidil éter (AGE), ya que con este compuesto se han realizado, a lo largo de los últimos años, diversos estudios de polimerización. Partiendo de esta base, se propone sintetizar monómeros con distinto grado de funcionalización con grupos epóxido. A continuación se exponen los esquemas retrosintéticos de los diferentes monómeros, todos ellos sintetizados a partir de compuestos comerciales de bajo coste.

a) **Monómero con un grupo oxirano:** el monómero más sencillo es el que presenta un grupo olefínico y un resto oxirano, es decir, el alil glicidil éter (Figura 10), asequible comercialmente.

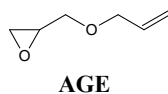
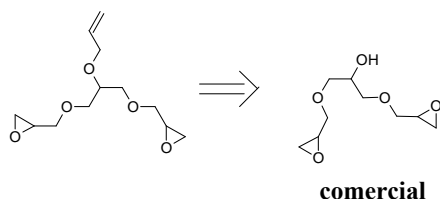


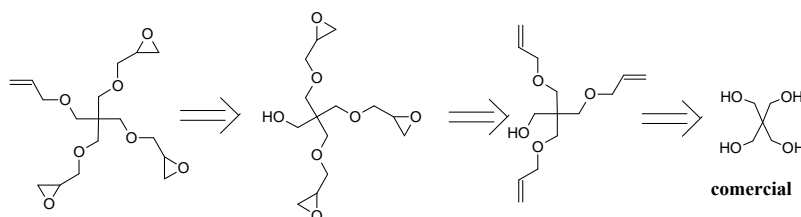
Figura 10. Producto comercial alil glicidil éter.

**b) Monómero con dos grupos oxiranos:** se ha preparado a partir del compuesto comercial 1,3-diglicidil glicerol éter y bromuro de alilo mediante una reacción  $S_N2$ .



**Esquema 20.** Retrosíntesis del monómero alquilo xirano funcionalizado con dos grupos epóxido.

**c) Monómero con tres grupos oxiranos:** se ha partido del compuesto comercial pentaeritritol, que mediante una reacción de alquilación con bromuro de alilo y posterior epoxidación con ácido *m*-cloroperbenzoico, conduce al compuesto final.



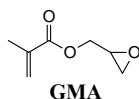
**Esquema 21.** Retrosíntesis del monómero alquilo xirano funcionalizado con tres grupos epóxido.

#### 4.1.1.2. Síntesis de monómeros metacriloxiranos.

En el diseño de nuevos monómeros metacriloxiranos, se ha tomado como fragmento metacrílico el metacrilato debido a su predisposición a la polimerización. Partiendo de esta base se propuso sintetizar monómeros con distinto grado de funcionalización con grupos epóxido.

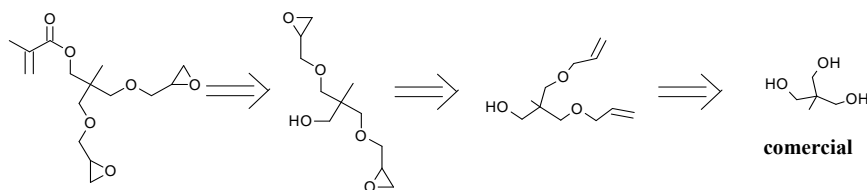
A continuación se exponen los esquemas retrosintéticos de los nuevos monómeros, todos ellos sintetizados a partir de compuestos comerciales de bajo coste.

**a) Monómero con un grupo oxirano:** el monómero más sencillo es el que presenta un grupo metacrilato y un resto oxirano, es decir, el glicidil metacrilato (GMA), disponible comercialmente.



**Figura 11.** Producto comercial alil glicidil éter.

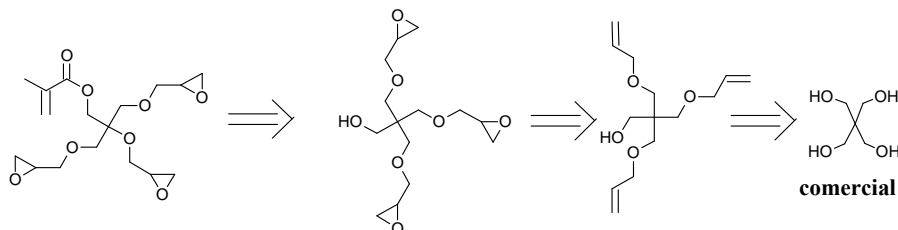
**b) Monómero con dos grupos oxiranos:** se obtiene a partir del compuesto del 2,2-bis[(glicidiloxi) metil] propan-1-ol, sintetizado previamente y posterior esterificación con cloruro de metacrilato.



**Esquema 22.** Retrosíntesis del monómero metacriloxirano funcionalizado con dos grupos epóxido.



c) **Monómero con tres grupos oxiranos:** se obtiene siguiendo la misma metodología que en el caso anterior, pero partiendo del pentaeritritol.



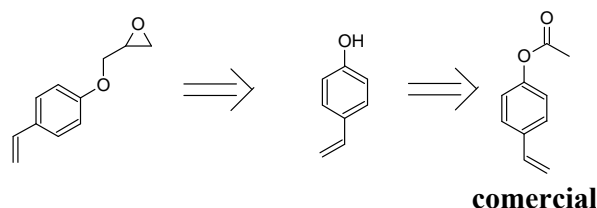
**Esquema 23.** Retrosíntesis del monómero metacriloxirano funcionalizado con tres grupos epóxido.

#### 4.1.1.3. Síntesis de monómeros ariloxiranos.

En el diseño de nuevos ariloxiranos, se ha tomado como fragmento arilo el estireno debido a su facilidad y predisposición a la polimerización. Partiendo de esta base se propuso sintetizar monómeros con distinto grado de funcionalización con grupos epóxido.

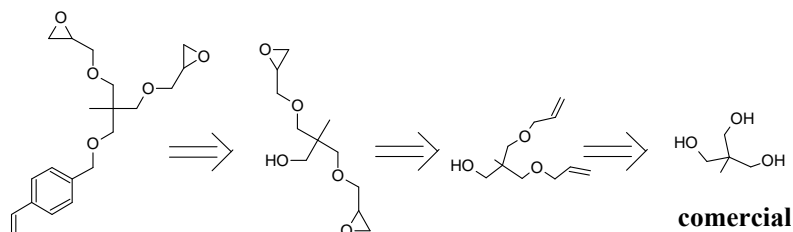
A continuación se exponen los esquemas retrosintéticos de los nuevos monómeros, todos ellos sintetizados a partir de compuestos comerciales de bajo coste.

a) **Monómero con un grupo oxirano:** partiendo del compuesto comercial acetiloxiestireno se llega al compuesto final, previa hidrólisis del resto acetilo y posterior alquilación con epiclorhidrina.



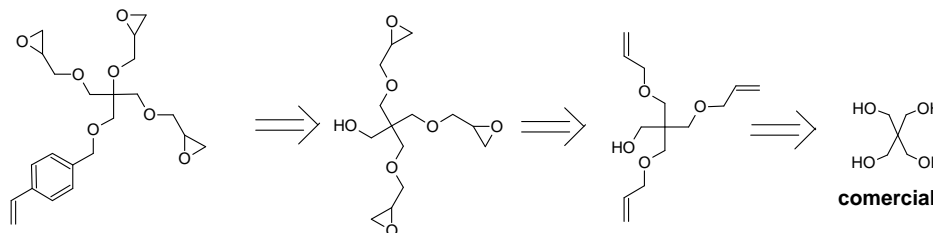
**Esquema 24.** Retrosíntesis del monómero ariloxirano funcionalizado con un grupo epóxido.

b) **Monómero con dos grupos oxiranos:** en este caso, se parte del compuesto comercial 1, 1, 1-tris (hidroximetil) etano, el cual sometido a una serie de reacciones sucesivas como alquilación con bromuro de alilo, epoxidación con ácido *m*-cloroperbenzoico y finalmente, alquilación con *p*-clorometilestireno, conduce al monómero deseado.



**Esquema 25.** Retrosíntesis del monómero ariloxirano funcionalizado con dos grupos epóxido.

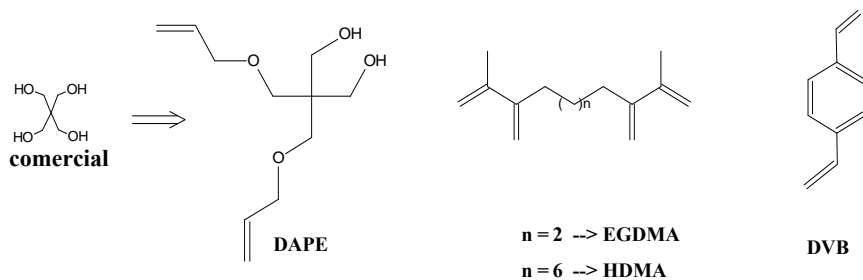
c) **Monómero con tres grupos oxiranos:** se obtiene siguiendo la misma secuencia de reacciones del caso anterior, pero partiendo del compuesto comercial pentaeritritol.



**Esquema 26.** Retrosíntesis del monómero ariloxirano funcionalizado con tres grupos epóxido.

#### 4.1.2. Síntesis de agente de entrecruzamiento.

También se puede graduar la hidrofiliicidad de los soportes poliméricos, utilizando crosslinker con distinto grado de hidrofiliicidad, por lo que se utilizarán diferentes agentes de entrecruzamiento. Todos ellos son asequibles comercialmente, excepto el dialil pentaeritritol éter (DAPE), que se sintetiza a partir del pentaeritritol y bromuro de alilo en medio básico.



**Esquema 27.** Agentes de entrecruzamientos empleados en esta Memoria.

#### 4.1.3. Síntesis de soportes polímeros.

Se llevarán a cabo las reacciones de polimerización entre los distintos monómeros y agentes de entrecruzamiento y los crosslinker más afines, con el fin de polímeros de distinto grado de hidrofiliicidad, ya que el carácter hidrofílico-hidrofóbico va a afectar a la hora de inmovilizar-estabilizar ciertas enzimas; unas preferirán un entorno más hidrofílico y otras, un entorno más hidrofóbico.

Teniendo en cuenta este criterio, se llevarán a cabo las siguientes polimerizaciones:

##### 4.1.3.1. Síntesis de polímeros de alquioxiranos con agentes de entrecruzamiento DAPE y DVB.

##### 4.1.3.2. Síntesis de polímeros de metacriloxiranos con agentes EGDMA y HDMA.

##### 4.1.3.3. Síntesis de polímeros de ariloxiranos con agente de entrecruzamiento DVB.

#### 4.2. Caracterización de los soportes poliméricos.

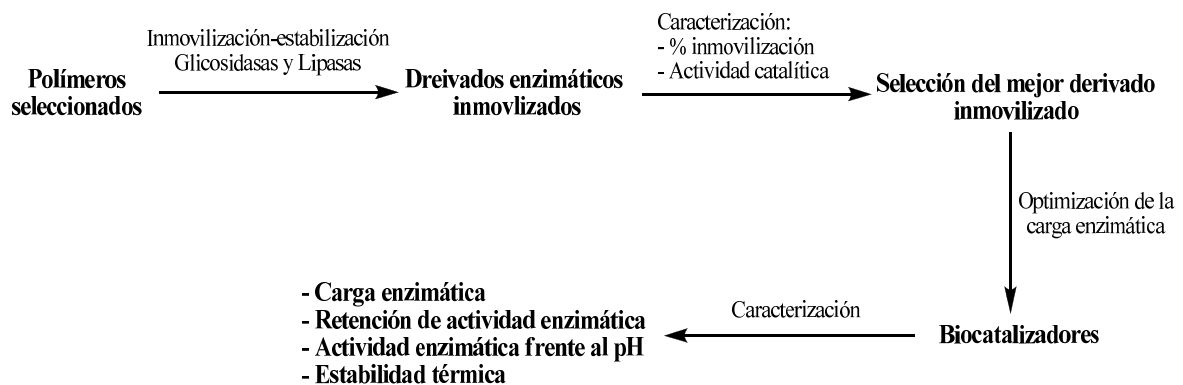
Paralelamente a la preparación de los soportes poliméricos, se va a realizar un estudio de caracterización de las porosidad y propiedades texturales de los mismos, ya que se pretende obtener soportes poliméricos con elevado tamaño de poro y la mayor superficie específica

posible modificando una serie de variables (proporción monómero/crosslinker, iniciador radicalario, temperatura, etc.) en la reacciones de polimerización.

De cada grupo de polimerización, se seleccionará el polímero que posea mejores propiedades texturales (mayor tamaño de poro con la mayor superficie específica posible) para llevar a cabo las pruebas de inmovilización-estabilización de enzimas.

#### 4.3. Obtención de biocatalizadores: Inmovilización-estabilización de enzimas.

Una vez realizada la caracterización de los diferentes polímeros, se procederá a realizar la inmovilización-estabilización de dos grupos diferentes de enzimas (Glicosidasas y Lipasas) sobre aquellos soportes que hayan presentado mejores propiedades texturales, analizando la cantidad de enzima inmovilizada en los polímeros y la actividad enzimática que poseen los derivados inmovilizados respecto a la enzima libre, con el fin de obtener derivados inmovilizados activos y estables. A continuación se seleccionarán los derivados inmovilizados que presenten una elevada carga enzimática y el mayor porcentaje de retención de actividad catalítica, para llevar a cabo la optimización de la carga enzimática, que dará lugar a los biocatalizadores que serán empleados en esta memoria. Para terminar se realizará una caracterización de dichos biocatalizadores, que incluirá: carga enzimática, porcentaje de retención de actividad enzimática, influencia del pH en la actividad catalítica y estabilidad térmica (Esquema 28).



**Esquema 28.** Proceso de obtención de biocatalizadores.

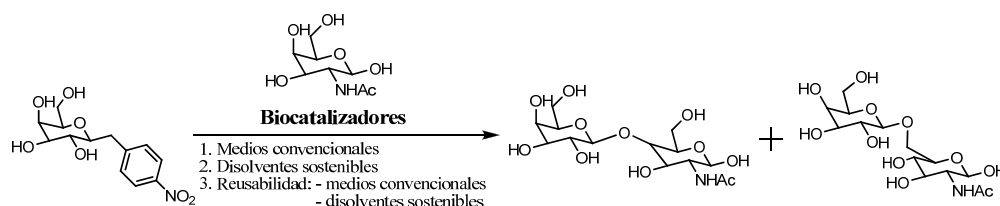
#### 4.4. Aplicaciones de los biocatalizadores.

Los Biocatalizadores obtenidos tras el proceso de inmovilización-estabilización de las diferentes enzimas, serán empleados en la síntesis enzimática de oligosacáridos, y en la resolución cinética y resolución cinética dinámica de diferentes alcoholes secundarios.

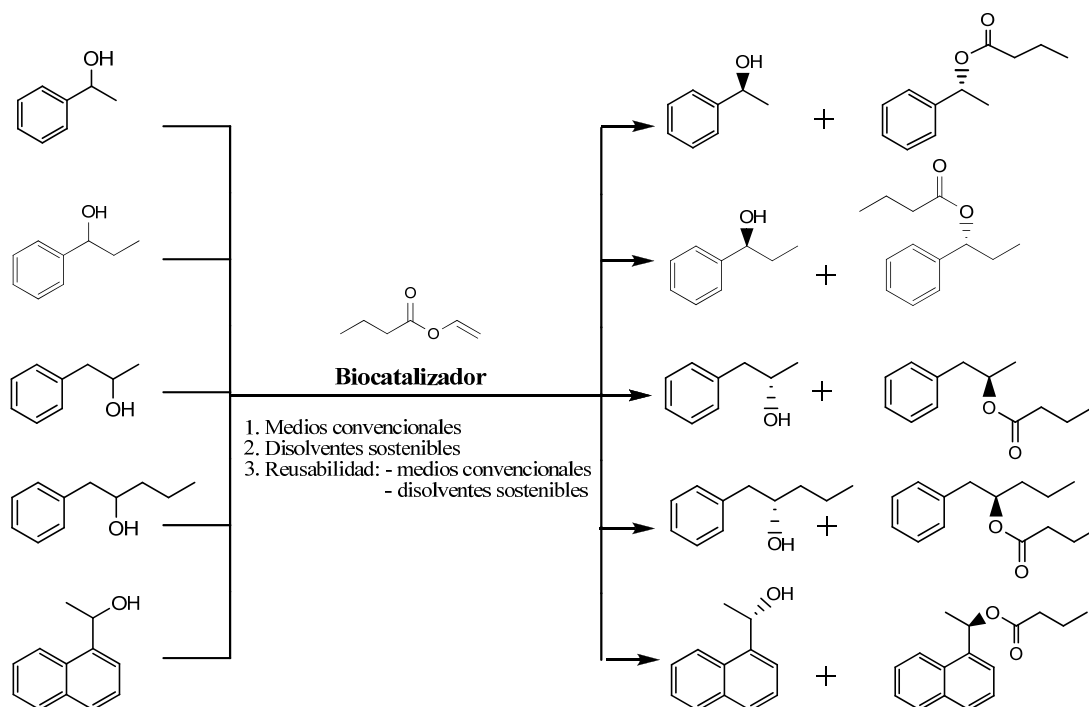
En concreto se llevarán a cabo, la síntesis regioselectiva de *N*-acetil-lactosamina con diferentes biocatalizadores obtenidos tras la inmovilización de las diferentes glicosidasas ( $\beta$ -galactosidasa

de *Bacillus circulans*,  $\beta$ -galactosidasa de *Escherichia coli*,  $\beta$ -galactosidasa recombinante de *Bacillus circulans* cepa americana y  $\beta$ -galactosidasa de *Thermus thermophilus* TTP0042), la resolución cinética de (*R,S*)-1-fenil-1-etanol, (*R,S*)-1-fenil-1-propanol, (*R,S*)-1-fenil-2-propanol, (*R,S*)-1-fenil-2-pentanol, (*R,S*)-1-(naftil) etanol y varias (*R,S*)-1,2-diaril-2-hidroxicetonas, y la resolución cinética dinámica de (*R,S*)-1-fenil-1-etanol y (*R,S*)-1,2-difenil-2-hidroxietanona con diferentes lipasas (lipasa de *Pseudomonas fluorescens*, lipasa de *Pseudomonas cepacia* y lipasa de *Pseudomonas stutzeri*).

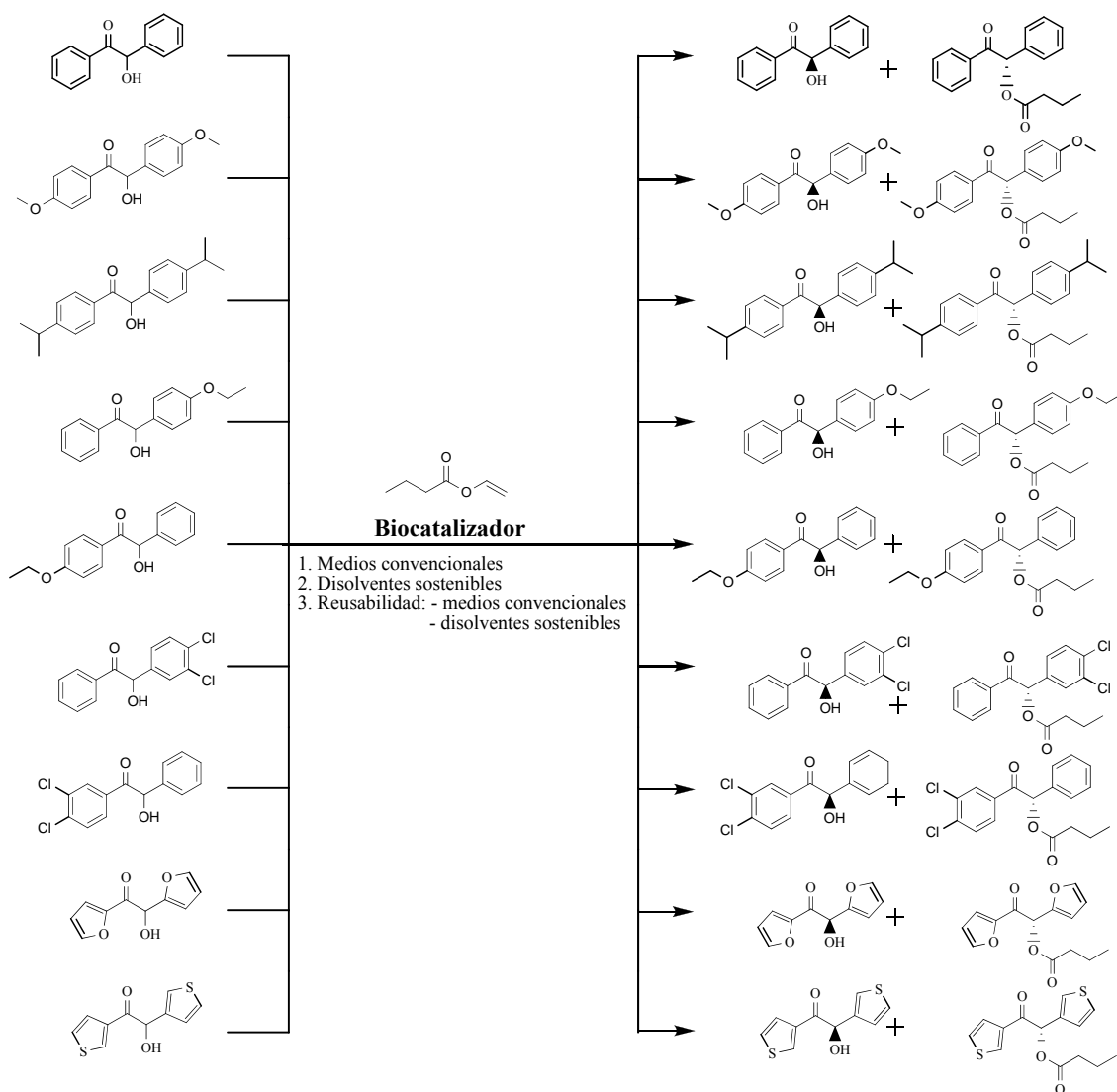
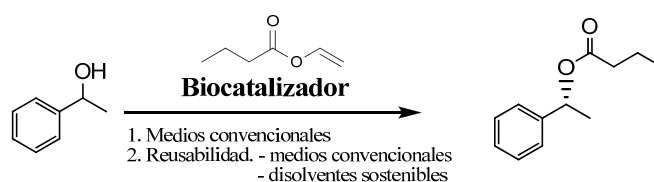
Las aplicaciones de los diferentes biocatalizadores se llevarán a cabo, como metodología sostenible, según los siguientes esquemas de trabajo (Esquemas 29, 30, 31, 32 y 33).



**Esquema 29.** Síntesis de *N*-acetil-lactosamina.



**Esquema 30.** Resoluciones cinéticas de (*R,S*)-1-fenil-1-etanol y sus derivados.

Esquema 31. Resoluciones cinéticas de  $(R,S)$ -1,2-diaril-2-hidroxicetonas.Esquema 32. Resolución cinética dinámica de  $(R,S)$ -1-difenil-1-etanol.Esquema 33. Resolución cinética dinámica de  $(R,S)$ -1,2-difenil-2-hidroxietanona.



## Capítulo V

# *Resultados y discusión*





## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Siguiendo el Plan de Trabajo propuesto, empezamos abordando la síntesis y caracterización de monómeros y agente de entrecruzamiento (crosslinker) que no son asequibles comercialmente.

### 5.1. Síntesis y caracterización de monómeros.

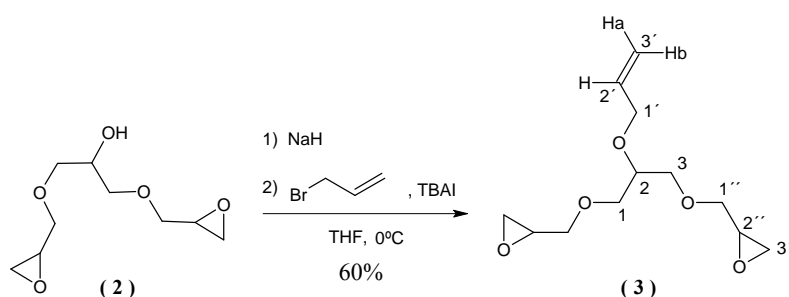
Se llevará a cabo la síntesis de los monómeros alquioxiranos (**3** y **7**), metacriloxiranos (**12** y **13**), ariloxiranos (**16**, **17** y **18**) y el agente de entrecruzamiento (**19**), aunque solo se realizará un estudio estructural de aquellos compuestos que se describan por primera vez; en el resto de los casos, daremos las referencias bibliográficas y sus datos espectroscópicos. Figurarán en la parte experimental.

#### 5.1.1. Síntesis y caracterización de monómeros alquioxiranos.

El alquioxirano más sencillo, es el que presenta un grupo epóxido, el alil glicidil éter (AGE) (**1**), que no se afronta su síntesis por ser comercial.

##### 5.1.1.1. Síntesis y caracterización de 2-alil-1,3-diglicidil glicerol éter (**3**).

El primer monómero que se sintetizó es el alquioxirano con dos grupos epóxidos, monómero **3**.



**Esquema 34.** Síntesis de 2-alil-1,3-diglicidil glicerol éter (**3**).

El monómero **3** se ha preparado a partir del diglicidil glicerol éter (**2**), en una sola etapa (Esquema 34), mediante una reacción  $S_N2$  con bromuro de alilo y base. De las distintas bases empleadas para abstraer el protón hidroxílico: trietil amina/tolueno,<sup>480</sup> NaOH y NaH, los mejores resultados se obtuvieron con NaH y TBAI en THF a 0° C, obteniéndose el compuesto **3** con un 60% de rendimiento, después de su purificación por columna cromatográfica.

El compuesto **3** se describe por primera vez y su determinación estructural se ha realizado por espectrometría de masas y diferentes técnicas de RMN:  $H^1$ ,  $C^{13}$ , DEPT, COSY, HSQC-HMQC y HMBC.

La masa exacta del espectro de masas del compuesto **3**, arrojó un pico molecular a 267.12 ( $M^+ + Na^+$ ) y una fórmula molecular probable de  $C_{12}H_{20}O_5$  que, posteriormente, se corroboró por RMN- $H^1$ , RMN- $C^{13}$  y DEPT.

La confirmación de que la reacción de alquilación con bromuro de alilo, se ha producido correctamente, queda de manifiesto al comprobar por RMN que el resto alilo se ha incorporado en el producto final (**3**).

Efectivamente, los protones olefínicos aparecen en la parte baja del espectro de RMN- $H^1$  (5-7 ppm); concretamente, el H-3'a resuena a  $\delta$  5.12 y acoplado con el H-2' con una constante de acoplamiento típica "cis" (J: 10.3 Hz), el protón H-3'b aparece a  $\delta$  5.24 acoplado con el H-2' con un acoplamiento típico "trans" (J: 17.2 Hz) y finalmente, el protón H-2' resuena a  $\delta$  5.87 como un "ddt" debido a sus acoplamientos con H-3'a, H-3'b y H-1'. El desglose de todas las constantes de acoplamiento (J) se releja en la parte experimental, y los acoplamientos mencionados se han realizado con ayuda del espectro bidimensional de RMN homonuclear (COSY).

La asignación de los carbonos olefínicos C-2' ( $\delta$  134.95) y C-3' ( $\delta$  116.81), se han realizado por RMN- $C^{13}$  (DEPT) y por el espectro bidimensional heteronuclear HSQC-HMQC, que muestran la conectividad entre los átomos de carbono y los átomos de hidrógenos unidos directamente ( $J^1$ ).

Para llevar a cabo las asignaciones del fragmento de glicerol, nos apoyamos en el espectro bidimensional HMBC, que muestra conectividades a largo alcance ( $J^3$ ), entre átomos de carbono y átomos de hidrógeno. En nuestro caso, se observó conectividad bidimensional entre el H-1' y el C-2 que resuena a  $\delta$  76.87. Una vez asignado el C-2, mediante el espectro HSQC, asignamos el desplazamiento de H-2 a 3.64 ppm como un multiplete, por sus acoplamientos con los metilenos  $CH_2-1$  y  $CH_2-3$ , cuyos cuatro protones resuenan a 3.50-3.60 ppm, según el espectro COSY. Finalmente, la asignación de C-1 ( $\delta$  71.16) y C-3 ( $\delta$  71.16), se realizó por el espectro HSQC-HMQC.

Únicamente nos queda por asignar los fragmentos glicilo ( $CH_2-1''$ ,  $CH-2''$  y  $CH_2-3''$ ). Nuevamente, apoyados en el espectro HMBC, pudimos asignar las señales correspondientes al metileno  $CH_2-1''$ , ya que mostraron conectividades bidimensionales con las señales del metileno  $CH_2-3$ , que previamente habían sido asignadas. Los protones del  $CH_2-1''$  aparecen diastereotópicos, resonando a 3.38 ppm (H-1''a) y a 3.74 (H-1''b), debido a que se encuentra en posición  $\alpha$  al centro quiral C-2''. Ambos protones aparecen como multiplete debido al acoplamiento geminal entre ellos y a los acoplamientos con los protones H-2'', H-3''a y H-3''b. Por HSQC-HMQC, se realizó la asignación de C-1'' a  $\delta$  71.99.

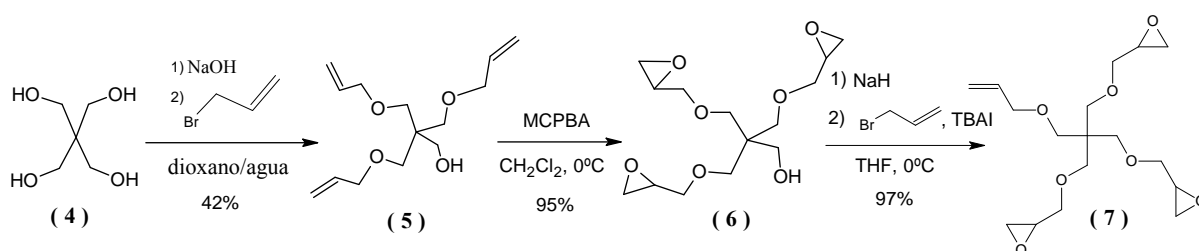
Las señales corres a los átomos del anillo de oxirano se han asignado utilizando la misma metodología. Es decir, según el espectro COSY, el protón H-1'' se encuentra acoplado con el H-2'' que resuena como un multiplete a 3.10 ppm y su átomo de carbono (C-2'') lo hace a

50.66 ppm, según el espectro HSQC-HMQC. A su vez, el protón H-2'' se encuentra acoplado con los protones H-3''a y H-3''b que, también aparecen como diastereotópicos a 2.56 y 2.74 ppm respectivamente. El C-3'', correspondiente a un carbono metilénico según el espectro DEPT, resuena a 44.03 ppm (HSQC-HMQC).

Después de este estudio, podemos afirmar que los datos espectroscópicos obtenidos para el compuesto **3**, están en consonancia con la estructura propuesta.

### 5.1.1.2. Síntesis y caracterización de alil triglicidil pentaeritritol éter (**7**).

El alquiloirano con tres grupos epóxido se ha sintetizado siguiendo el siguiente esquema de reacciones (Esquema 35).



**Esquema 35.** Síntesis de alil triglicidil pentaeritritol éter (**7**).

Partiendo del compuesto comercial pentaeritritol (**4**) y utilizando NaOH, como base,<sup>481</sup> en dioxano-H<sub>2</sub>O, se lleva a cabo la sustitución nucleófila con 3 equivalentes de bromuro de alilo, obteniéndose el compuesto (**5**) con un 42% de rendimiento, después de su purificación en columna cromatográfica. La epoxidación de los resto alilo se lleva a cabo con ácido *m*-cloroperbenzoico (MCPBA)<sup>482</sup> en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a 0° C, obteniéndose el compuesto (**6**) con un 95% de rendimiento. Finalmente, una mera alquilación con bromuro de alilo empleando como base NaH en THF a 0°C, se obtiene el compuesto (**7**) con un 97% de rendimiento, como un aceite transparente que no requiere purificación.

La síntesis del compuesto **7** ha sido descrita previamente<sup>483</sup> y su caracterización estructural se ha realizado de forma similar al compuesto anterior, detallándose sus datos espectroscópicos en la parte experimental.

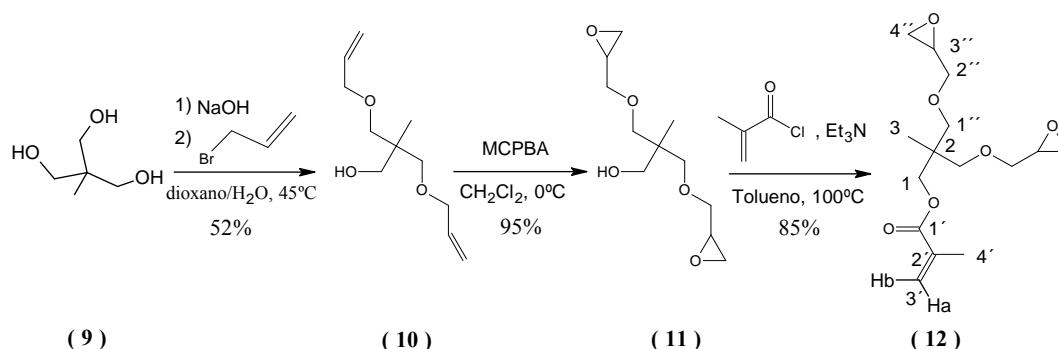
### 5.1.2. Síntesis y caracterización de monómeros metacriloxiranos

El metacriloxirano con un grupo epóxido, el glicidil metacrilato (GMA) (**8**), es asequible comercialmente, por lo que abordamos la síntesis de los monómeros funcionalizados con 2 y 3 grupos epóxido.

#### 5.1.2.1. Síntesis y caracterización de {{2,2-bis [(glicidiloxi) metil]} propil} metacrilato (**12**).

La síntesis del monómero **7** se ha realizado siguiendo el siguiente esquema de reacción (Esquema 36).

Partiendo del compuesto comercial 1, 1, 1-tris(hidroximetil)etano (**9**), 3 equivalentes de NaOH en dioxano/H<sub>2</sub>O y 2 equivalentes de bromuro de alilo, y tras el tratamiento del crudo de reacción con HCl (2%) y posterior purificación por cromatografía en columna, se obtiene el compuesto **10** con un 55% de rendimiento como un aceite amarillento. La epoxidación del compuesto **10** con MCPBA en diclorometano a 0°C, condujo al compuesto **11** con un 95% de rendimiento, que no necesita purificación. La esterificación del compuesto **11** con cloruro de metacrililo y trietil amina en tolueno,<sup>484</sup> condujo al compuesto **12** con un 85% de rendimiento, como un aceite incoloro, después de su purificación en columna.



**Esquema 36.** Síntesis de {{2,2-bis[(glicidiloxi)metil]}propil} metacrilato (**12**).

La síntesis del compuesto **12** se describe por primera vez, y la determinación estructural del mismo se ha realizado siguiendo la misma metodología que para los monómeros anteriores. El espectro de masas exactas presentó picos correspondientes a  $(M+H)^+$  301.16 y  $(M+Na)^+$  323.14, y entre las posibles fórmulas moleculares para esta masa, se encuentra la C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>O<sub>6</sub> que se confirmó por RMN-C<sup>13</sup> y DEPT.

En el espectro de RMN-H<sup>1</sup>, los protones olefínicos resuenan a  $\delta$  6.08 (H-3'b) y a  $\delta$  5.54 (H-3'a), ambos como multipletes anchos; se encuentra más desapantallado el H-3'b por estar en posición "cis" con el grupo ester del metacrilato. Ambos protones forman parte del metileno olefínico, cuyo átomo de carbono C-3' aparece a 125.30 ppm, y cuya asignación se ha realizado mediante el espectro HSQC-HMQC.

Las señales correspondientes al grupo metilo CH<sub>3</sub>-4' ( $\delta_{H-4'}$ : 1.93 singlete y  $\delta_{C-4'}$ : 18.33) se asignaron, inequívocamente, a través del espectro HMBC, observándose conectividades bidireccionales ( $J^3_{C-H}$ ) con las señales de CH<sub>2</sub>-3' y con C-1' ( $\delta$  167.20). Una vez asignadas todas las señales del grupo metacrilato y apoyados con el espectro bidimensional HMBC, se asignan el resto de las señales. Así, el C-1' mostró una conectividad ( $J^3_{C-H}$ ) con un singlete a 4.07 ppm y que corresponde a los protones del metileno CH<sub>2</sub>-1; la asignación del C-1 ( $\delta$  66.87) se realizó a través del espectro de HSQC-HMQC.

La mayor dificultad radica en la asignación de la señal de los metilenos CH<sub>2</sub>-1'' y CH<sub>2</sub>-2''. De nuevo, la solución nos la proporcionó el espectro HMBC, al mostrar conectividades  $J^3_{C-H}$  entre el singlete a 4.07 (H-1) y el átomo de carbono que resuena a 73.65 ppm y que

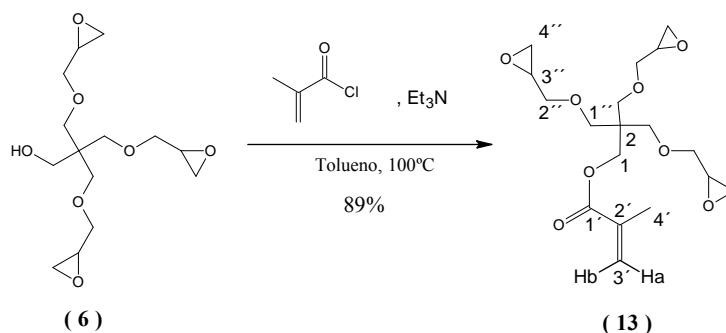
corresponde al C-1''. Una vez asignado el C-1'', gracias al espectro HSQC-HMBC se puede asignar los protones del metileno CH<sub>2</sub>-1''; estos protones aparecen a  $\delta$  3.37 (H-1''a) y  $\delta$  3.42 (H-1''b), acoplados entre sí con una J: 9.0 Hz. El CH<sub>2</sub>-1 también presenta conectividad, según el HMBC, con el metilo CH<sub>3</sub>-3 que resuena como triplete a 0.99 ppm (H-3) y a 17.24 ppm (C-3). Finalmente, la asignación del resto glicidil se realizó recurriendo al espectro HMBC, encontrando conectividad entre el C'1'' y los protones H-2''a ( $\delta$  3.35) y H-2''b ( $\delta$  3.69), ambos protones aparecen como doble doblete (dd) debido al acoplamiento geminal de 11.6 Hz y al acoplamiento  $J_{2''a, 3''}$ : 5.6 Hz y  $J_{2''b, 3''}$ : 2.8 Hz). En el espectro COSY, se observa que los protones H-2'' están acoplados con el protón H-3'' ( $\delta$  3.09) y éste con los protones del metileno CH<sub>2</sub>-4'', que resuenan como diasterotópicos por encontrarse en posición  $\alpha$  al centro quiral C-3, resonando H<sub>a</sub>-4'' a 2.57 ppm con una multiplicidad "dd" ( $J_{4''a, 4''b}$ : 5.0 y  $J_{4''a, 3''}$ : 2.7 Hz), mientras que el H<sub>b</sub>-4'' resuena a 2.76 ppm como "dd" ( $J_{4''b, 4''a}$ : 5.0 y  $J_{4''b, 3''}$ : 4.8 Hz). Los átomos de carbono se asignaron mediante el empleo del espectro HSQC-HMBC, C-3'' ( $\delta$  50.85) y C-4'' ( $\delta$  44.06).

Sólo quedan por asignar las señales correspondientes a dos carbonos cuaternarios: C-2 y C-2', que atendiendo a la gran diferencia de desplazamientos químicos, uno olefínico y otro alquílico, se asignan fácilmente como  $\delta_{C-2}$  40.35 y  $\delta_{C-2'}$  136.40.

Finalizado el estudio de caracterización del compuesto **12** podemos afirmar que todos los datos espectroscópicos concuerdan con la estructura propuesta.

### 5.1.2.2. Síntesis y caracterización de triglicidil pentaeritritil metacrilato (**13**).

El monómero **13** se sintetiza de forma similar al compuesto **12**, pero a través del compuesto **6**, sintetizado previamente (Esquema 37). Después de su purificación por cromatografía en columna se obtiene con un 89% de rendimiento como aceite amarillento.



**Esquema 37.** Síntesis y caracterización de triglicidil pentaeritritil metacrilato (**13**).

El compuesto **13** también se describe por primera vez y su determinación estructural se realizó de forma muy similar a la del monómero **12**, por su gran similitud estructural.

El espectro de masas exactas presenta picos  $(M+H)^+$  a 373.19 y  $(M+Na)^+$  a 395.17, y una fórmula molecular probable de C<sub>18</sub>H<sub>28</sub>O<sub>8</sub>, que está de acuerdo con los espectros de RMN-C<sup>13</sup> y DEPT.

Las señales del espectro de RMN- $^1\text{H}$  a campo más bajo, corresponden a los protones olefínicos H-3'b ( $\delta$  6.07) y H-3a ( $\delta$  5.53). En el espectro HSQC-HMQC estos protones están directamente unidos al C-3' ( $\delta$  125.32) y a través de  $J^3$  están conectados con el C-1' ( $\delta$  167.01) y con el C-4' ( $\delta$  18.32), según el espectro HMBC. Según el espectro HSQC-HMQC se asignaron los protones del  $\text{CH}_3$ -4' que resuena a 1.93 ppm, como singlete ancho.

Apoyados en el  $\delta_{\text{C-1'}}$  y empleando el espectro HMBC, asignamos las señales del metileno  $\text{CH}_2$ -1: H-1 ( $\delta$  4.19) y C-1 ( $\delta$  63.67). Igualmente, los protones H-1 presentan conectividad con C-1'' ( $\delta$  63.93), según el espectro HMBC. El C-1'' está directamente unido a dos protones que resuenan a 3.48 ppm (ddd,  $J_{1''\text{a}, 1''\text{b}}$ : 9.4,  $J_{1''\text{a}, 2''\text{a}}$ : 2.5,  $J_{1''\text{a}, 2''\text{b}}$ : 2.5 Hz) correspondiente al protón H-1''a y a 3.54 ppm (ddd,  $J_{1''\text{b}, 1''\text{a}}$ : 9.4,  $J_{1''\text{b}, 2''\text{a}}$ : 1.5,  $J_{1''\text{b}, 2''\text{b}}$ : 1.5 Hz) correspondiente al protón H-1''b. A su vez, el C-1'' presentó conectividades  $J^3$  con los protones  $\text{CH}_2$ -2'' que resuenan a 3.34 ppm correspondiente a H-2''a con una multiplicidad “ddd” (ddd,  $J_{2''\text{a}, 2''\text{b}}$ : 11.8,  $J_{2''\text{a}, 3''}$ : 5.8,  $J_{2''\text{a}, 1''\text{a}}$ : 2.5 Hz) y a 3.54 ppm correspondiente al protón H-2''b que aparece también como “ddd” (ddd,  $J_{2''\text{b}, 2''\text{a}}$ : 11.8,  $J_{2''\text{b}, 3''}$ : 2.5,  $J_{2''\text{b}, 1''\text{b}}$ : 1.5 Hz). Según el espectro HSQC-HMQC, el C-2'' aparece a 72.08 ppm. Los protones H-2'' están conectados, según el espectro COSY, con el H-3'' ( $\delta$  3.08), que presenta los siguientes acoplamientos:  $J_{3'', 2''\text{a}}$ : 5.8,  $J_{3'', 4''\text{b}}$ : 4.8,  $J_{3'', 4''\text{a}}$ : 2.7 y  $J_{3'', 2''\text{b}}$ : 2.5 Hz, y mediante el espectro HSQC se asigna el desplazamiento del C-3'' a 50.73 ppm. A su vez, el protón H-3'' está acoplado, según el espectro COSY, con H-4''a a 2.55 ppm (dd,  $J_{4''\text{a}, 4''\text{b}}$ : 5.0,  $J_{4''\text{a}, 3''}$ : 2.7 Hz) y H-4''b a 2.75 ppm (dd,  $J_{4''\text{b}, 4''\text{a}}$ : 5.0,  $J_{4''\text{b}, 3''}$ : 4.8 Hz); el C-4'' aparece a 44.05 en el espectro HSQC-HMQC.

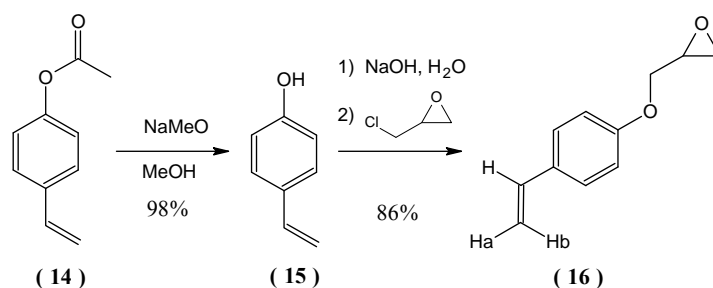
Finalmente, quedan por asignar los carbonos cuaternarios C-2 y C-2'. Que según sus desplazamientos químicos, asignamos  $\delta_{\text{C-2}}$  136.37 y  $\delta_{\text{C-2}}$  44.86 ppm.

Todos los datos espectroscópicos concuerdan con la estructura propuesta para el compuesto **13**.

### 5.1.3. Síntesis y caracterización de monómeros ariloxiranos.

#### 5.1.3.1. Síntesis y caracterización de *p*-glicidil estireno (**16**).

El monómero ariloxirano con un grupo epóxido se sintetiza, fácilmente, en dos etapas, según el siguiente esquema de reacción (Esquema 38).



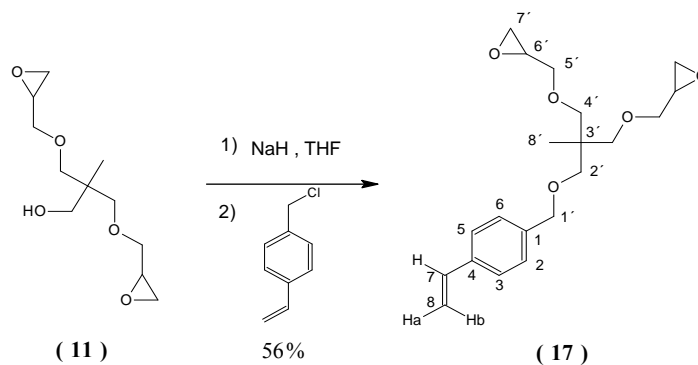
Esquema 38. Síntesis de *p*-glicidil estireno (**16**).

Partiendo del compuesto comercial *p*-acetoxi estireno (**14**), la primera etapa consiste en la desprotección del resto acetilo mediante una reacción Zemplen<sup>485</sup> con NaMeO/MeOH, dando lugar al compuesto **15** que no necesita purificación. La siguiente etapa de reacción es la alquilación del fenol con epiclorhidrina y NaOH/H<sub>2</sub>O, que debe hacerse en atmósfera inerte y al abrigo de la luz, debido a la facilidad de polimerización del *p*-hidroxiestireno.<sup>486</sup>

El monómero **16** ya está descrito en la literatura,<sup>487</sup> y sus datos espectroscópicos (ver parte experimental), están en concordancia con los publicados.

### 5.1.3.2. Síntesis y caracterización de *p*-{2,2-bis[(glicidiloxi)metil]propanoxi}metil} estireno (**17**).

El ariloxirano con dos grupos epóxido se sintetizó según el siguiente esquema (Esquema 39).



**Esquema 39.** Síntesis de *p*-{2,2-bis[(glicidiloxi)metil]propanoxi}metil} estireno (**17**).

Los dos grupos epóxido los aporta el compuesto **11**, sintetizado previamente, y como resto estireno se emplea el compuesto comercial *p*-clorometilestireno, que con NaH, como base, conduce al monómero **17** mediante una reacción S<sub>N</sub>2.

El monómero **17** es la primera vez que se describe y su determinación estructural se ha realizado siguiendo la misma metodología que en los compuestos anteriores.

El espectro de masas exactas presenta los picos moleculares a 394.18 (M+H)<sup>+</sup> y 371.18 (M+Na)<sup>+</sup> y una fórmula molecular probable de C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>5</sub>, que fue confirmada por RMN-C<sup>13</sup> y DEPT.

Se comenzó asignando los protones olefínicos, ya que así, podemos asignar inequívocamente los protones aromáticos. En el espectro de RMN-H<sup>1</sup>, aparecen a 7.72 ppm un doblete con una J: 17.8 Hz, que al tratarse de un acoplamiento “trans” entre dos protones, esta constante de acoplamiento debe corresponder a J<sub>8b, 7</sub>, por lo que este desplazamiento químico debe corresponder al protón H-8b; por su parte, el H-8<sup>a</sup> aparece a 5.21 ppm y presenta una J<sub>8a, 7</sub>: 11.0 Hz, propia de un acoplamiento “cis”. El H-7 se asigna a través del espectro COSY, resonando a 6.70 ppm como un doblete (dd) por su acoplamiento con H-8<sup>a</sup> y H-8b. Las

asignaciones de los carbonos olefinicos,  $\delta_{C-7}$  136.58 y  $\delta_{C-8}$  113.59 se realizó gracias al espectro bidimensional HSQC-HMQC.

A través de las señales correspondientes a los protones olefinicos y mediante el empleo del espectro HMBC, se asignaron todas las señales correspondientes a los átomos del anillo aromático. Así, las señales correspondientes a CH-7 muestran conectividades bidimensionales ( $J^3$ ) con las señales CH-3 y CH-5. Los protones H-3 y H-5 resuenan a 7.37 ppm con una constante de acoplamiento  $J_{3,2} = J_{5,6}$ : 7.5 Hz, producto de un acoplamiento de dos protones en disposición “orto”, y sus átomos de carbono C-3 y C-5 lo hacen a 126.10 ppm. El átomo de carbono cuaternario C-4 ( $\delta$  136.75) se asignó, igualmente, con el HMBC, ya que mostró conectividades con los protones olefinicos H-8a y H-8b.

Dado que los protones H-3 y H-5 están acoplados con los protones H-2 y H-6, respectivamente, las asignaciones de éstos, se realizan a través del espectro COSY,  $\delta_{H-2} = \delta_{H-6}$ : 7.27 ppm y la asignación de los carbonos C-2 y C-6, se realizó con el HSQC-HMQC, siendo en ambos casos de 127.54 ppm. Del anillo aromático, sólo resta por asignar el C-1 ( $\delta$  138.49), que se realiza con el HMBC al encontrarse acoplado ( $J^3_{C,H}$ ) con los protones H-3 y H-5.

El metileno bencílico CH<sub>2</sub>-1' se asignó fácilmente a través del espectro HMBC, pues mostró conectividad bidireccional con los CH-2 y CH-6: los protones H-1' aparecen como singletes a 4.47 ppm y su C-1' a 72.98 ppm. A su vez, el CH<sub>2</sub>-1' mostró conectividad  $J^3_{C,H}$  con CH<sub>2</sub>-2', por lo que permitió llevar a cabo sus asignaciones, resonando los H-2' como singlete a 3.34 ppm, y su C-2' a 72.82 ppm. Igualmente, el CH<sub>2</sub>-2' mostró conectividad bidireccional  $J^3_{C,H}$  con CH<sub>3</sub>-8' ( $\delta_{H-8'}$ : 0.97 y  $\delta_{C-8'}$ : 17.42) y con CH<sub>2</sub>-4', lo que nos permite llevar a cabo la asignación de este metileno; en este caso, los protones no resuenan como equivalentes, sino que lo hacen a  $\delta_{H-4'a}$ : 3.35 y  $\delta_{H-4'b}$ : 3.40 ppm y ambos aparecen acoplados entre sí con una J: 9.0 Hz. La asignación del C-4' ( $\delta$  74.01) con ayuda del espectro HSQC-HMQC.

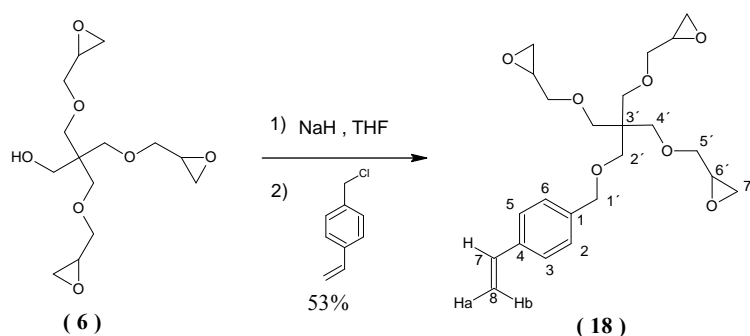
Finalmente el resto glicidilo se asignó como ya se ha comentado en el estudio de estos monómeros, es decir, el CH<sub>2</sub>-4' mostró conectividades bidireccionales en el HMBC ( $J^3_{C,H}$ ) con el metileno CH<sub>2</sub>-5' ( $\delta_{H-5'a}$ : 3.36,  $\delta_{H-5'b}$ : 3.66 y  $\delta_{C-5'}$ : 71.98) y a través del espectro COSY se asignaron las señales correspondientes a CH-6' ( $\delta_{H-6'}$ : 3.08 y  $\delta_{C-6'}$ : 50.86) y CH<sub>2</sub>-7' ( $\delta_{H-7'a}$ : 2.56,  $\delta_{H-7'b}$ : 2.75 y  $\delta_{C-7'}$ : 44.19). Únicamente, falta por asignar una señal de RMN-C<sup>13</sup> que aparece como carbono cuaternario a 41.09 ppm y que se debe corresponder a C-3'.

Todos los estos datos, están en consonancia con la estructura propuesta para el compuesto **17**.

### 5.1.3.3. Síntesis y caracterización de *p*-[(triglicidil pentaeritroxi)metil]estireno (**18**).

Finalmente, se sintetizó el último monómero, el ariloxirano con tres grupos epóxido repitiendo la misma metodología que en el compuesto **17**, pero esta vez partiendo del compuesto **6**, sintetizado previamente (Esquema 40).





**Esquema 40.** Síntesis de *p*-[(triglicidil pentaeritroximetil] estireno (**18**).

El monómero **18**, tampoco está descrito en la literatura, por lo que pasamos a realizar su determinación estructural.

Las masas exactas de este compuesto dieron unas masas de  $421.2 (M+H)^+$  y  $(M+Na)^+$  y una fórmula molecular probable de  $C_{23}H_{32}O_7$ , que se confirmó con el espectro de RMN- $C^{13}$  y DEPT.

Atendiendo a los  $\delta$  y  $J$  de los protones olefinicos, en el espectro de RMN- $H^1$ , se asignaron las señales H-8a ( $\delta$  5.21,  $J_{8a,7}$ : 10.7 Hz), H-8b ( $\delta$  5.72,  $J_{8b,7}$ : 17.5 Hz) y H-7 ( $\delta$  6.69) y mediante el espectro HSQC-HMQC se asignaron C-7 ( $\delta$  136.58) y C-8 ( $\delta$  113.59).

En el espectro de HMBC se observaron las siguientes conectividades:  $CH_2$ -8 con C-4 ( $\delta$  136.74) y CH-7 con CH-3 y CH-5 ( $\delta_{H-3}=\delta_{H-5}$ : 7.36 ppm y  $\delta_{C-3}=\delta_{C-5}$ : 126.11).

En el espectro COSY, los protones H-3 y H-5 se ven acoplados con los protones H-2 y H-6 respectivamente ( $\delta_{H-2}=\delta_{H-6}$ : 7.26 ppm y  $\delta_{C-2}=\delta_{C-6}$ : 127.60).

De nuevo, no apoyamos en el espectro HMBC para asignar las señales correspondientes a: a) C-1 ( $\delta$  138.41) por su  $J^3_{C,H}$  con H-3 y H-5; b)  $CH_2$ -1' ( $\delta_{H-1'}$ : 4.46,  $\delta_{C-1'}$ : 73.00) por su conectividad  $J^3_{C,H}$  con CH-2 y CH-6; c)  $CH_2$ -2' ( $\delta_{H-2'}$ : 3.46 y  $\delta_{C-2'}$ : 68.95) por su conectividad  $J^3_{C,H}$  con  $CH_2$ -1'; d)  $CH_2$ -4' ( $\delta_{H-4'a}$ : 3.48,  $\delta_{H-4'b}$ : 3.52,  $J_{4'a,4'b}$ : 9.3 Hz y  $\delta_{C-4'}$ : 70.08) por su conectividad bidireccional  $J^3_{C,H}$  con  $CH_2$ -2'; e)  $CH_2$ -5' ( $\delta_{H-5'a}$ : 3.36,  $\delta_{H-5'b}$ : 3.66 y  $\delta_{C-5'}$ : 72.01) por su conectividad bidireccional  $J^3_{C,H}$  con  $CH_2$ -4'.

Finalmente, mediante el espectro COSY, se observa que los protones  $CH_2$ -5' están acoplados con el CH-6' ( $\delta_{H-6'}$ : 3.08,  $\delta_{C-6'}$ : 50.79) y el H-6', está, a su vez, acoplado con los protones del metileno  $CH_2$ -7' ( $\delta_{H-7'a}$ : 2.56,  $\delta_{H-7'b}$ : 2.74 y  $\delta_{C-7'}$ : 44.18).

Sólo queda por asignar una señal del espectro de RMN- $C^{13}$  que aparece a 45.69 ppm y que corresponde a un átomo de carbono cuaternario, por lo debe corresponder a C-3'.

Todos los datos espectroscópicos están en consonancia con la estructura propuesta para el compuesto **18**.

## 5.2. Síntesis y caracterización de agente de entrecruzamiento.

De todos los agentes de entrecruzamiento empleados en esta memoria de tesis (19-22) (Figura 12), únicamente el crosslinker **19** no es asequible comercialmente, por lo que abordamos su síntesis.

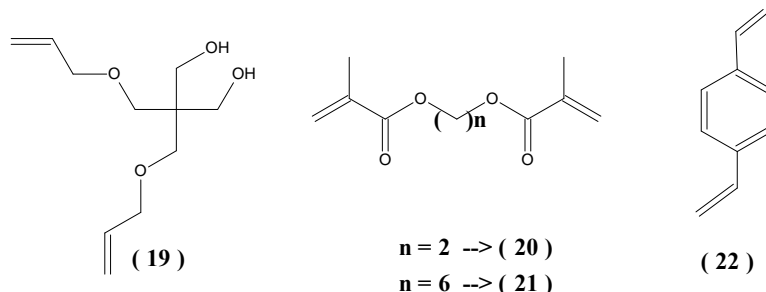
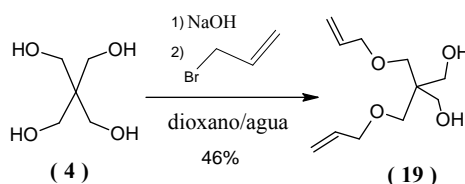


Figura 12. Agentes de entrecruzamiento empleados en esta memoria.

### 5.2.1. Síntesis y caracterización del dialil pentaeritritol éter (19).

El dialil pentaeritritol éter (**19**) se sintetizó siguiendo el método habitual, a partir del pentaeritritol,<sup>481</sup> según el siguiente esquema de reacción (Esquema 41).



Esquema 41. Síntesis y caracterización del dialil pentaeritritol éter (19).

Los rendimientos de estas reacciones no son elevados, pues se obtienen mezclas de reacción que hay que purificar por cromatografía en columna.

Los datos espectroscópicos del compuesto **19** (ver parte experimental), coinciden con los datos publicados para este compuesto.<sup>481</sup>

## 5.3. Síntesis, superficie específica y porosidad de los soportes poliméricos.

Los polímeros porosos se caracterizan por poseer una estructura permanente porosa, formada durante su preparación, que persiste incluso en el estado seco. Su estructura interna consta de numerosas cavidades interconectadas (poros) de diferentes tamaños y su rigidez estructural está asegurada a través de una elevada reticulación.<sup>488, 489</sup> La porosidad de estos materiales se consigue generalmente como resultado de la separación de fases que se produce durante la polimerización de una mezcla de reacción que contiene las cantidades apropiadas de monómero, agente de entrecruzamiento y disolvente porogénico.

- **Síntesis de polímeros:**

La técnica de polimerización empleada en la síntesis de los diferentes grupos de polímeros ha sido la polimerización en disolución por vía radicalaria utilizando un disolvente porogénico.<sup>15-17, 490</sup>

Con el objetivo de obtener una batería de polímeros con distinta hidrofiliidad y diferente grado de epoxidación se han empleado tres grupos de monómeros diferentes (alquílicos: **1**, **3** y **7**; metacrílicos: **8**, **12**, **13**, **23** y **24** y arílicos: **16**, **17** y **18**) y cuatro agentes de entrecruzamiento, uno alquílico (**19**), dos metacrílicos (**20** y **21**) y uno arílico (**22**).

Los factores que más influyen en la inmovilización-estabilización de enzimas son el tamaño de poro y la superficie específica del soporte.<sup>491</sup> La inmovilización de la enzima en el interior de los poros del soporte aumenta su estabilidad operacional al prevenir posibles procesos intermoleculares (proteólisis, agregación, etc.) y preservar la enzima de interacciones con interfases externas (aire, oxígeno, disolventes orgánicos inmiscible, etc.).<sup>492-495</sup> Por lo tanto, es importante que los soportes posean un tamaño de poro elevado para facilitar la accesibilidad de la enzima dentro de los poros y también para evitar problemas de difusión de sustrato a la enzima. En cualquier proceso de inmovilización-estabilización de enzimas, es deseable disponer de soportes con elevada superficie específica a fin de hacer posible la inmovilización de grandes cantidades de enzima para reducir el volumen del catalizador, logrando así, un derivado enzimático inmovilizado con alta actividad por gramo de soporte.

Con el objetivo de obtener soportes con elevado tamaño de poro y la mayor superficie específica posible, en esta memoria de tesis se ha realizado un proceso de optimización en la síntesis de los soportes poliméricos teniendo en cuenta distintas variables empleadas previamente por otros grupos de investigación (disolvente porogénico, porcentaje de agente de entrecruzamiento, iniciador radicalario, temperatura y agentes surfactantes). De estos estudios previos, se pueden resumir las siguientes conclusiones:

a) Efecto del disolvente porogénico: El mecanismo clásico de formación de poros durante la polimerización depende del tipo de disolvente porogénico utilizado para crear la estructura porosa.<sup>496</sup> El disolvente porogénico no reacciona durante el proceso de polimerización, pero se mantiene dentro de los poros, donde se encuentra rodeado por el material polimerizado, siendo eliminado una vez ha terminado la polimerización en el proceso de tratamiento del polímero. En la mayoría de los casos, los disolventes porogénicos son simples disolventes orgánicos o mezclas de estos.<sup>497, 498</sup>

b) Efecto del porcentaje de agente de entrecruzamiento: Variar el porcentaje de agente de entrecruzamiento en la mezcla de reacción no sólo afecta a la porosidad, también afecta a la composición química de los soportes, y por lo tanto a su grado de funcionalización. Al aumentar el porcentaje de agente de entrecruzamiento, el tamaño medio de poro disminuye, como resultado de la temprana formación de glóbulos altamente reticulados con una baja tendencia a unirse y aumenta la superficie específica del soporte.<sup>17, 490, 499-501</sup>

c) Efecto de iniciador radicalario y la temperatura de polimerización: Los iniciadores de radicales libres descomponen a una temperatura particular, iniciando el proceso de polimerización radicalaria en disolución. Los polímeros que se forman por polimerización en

disolución se vuelven insolubles en el medio de reacción, debido tanto a su reticulación como al bajo poder de disolución de disolvente porogénico, y precipitan formando así núcleos. Estos núcleos crecen durante la polimerización hasta alcanzar el tamaño de glóbulos. Los glóbulos y sus agrupaciones constituyen las unidades elementales morfológicas del polímero poroso entrecruzado. Al aumentar la temperatura de polimerización o el porcentaje de iniciador radicalario, aumenta el número de radicales libres producidos y por lo tanto, aumenta el número de núcleos y glóbulos se forman. Si la proporción de monómero y agente de entrecruzamiento en el sistema se mantiene constante, un mayor número de glóbulos se traduce en un tamaño más pequeño. Dado que los materiales porosos están compuestos de una matriz de glóbulos interconectados, si los glóbulos son más pequeños, los poros serán más pequeños.<sup>502</sup>

d) Efectos de los agentes surfactantes: Es bien sabido que el tamaño de los poros de los materiales mesoporosos se puede ajustar utilizando surfactantes con cadenas de diferentes tamaños.<sup>503, 504</sup> En general, los materiales de poros grandes se obtienen empleando surfactantes de alto peso molecular, mientras que los surfactantes de bajo peso dan lugar a materiales con poros más pequeños.<sup>505</sup>

El proceso de optimización de la síntesis de los polímeros desarrollado en esta memoria de tesis se ha llevado a cabo empleando ciclohexanol como disolvente porogénico, distintos porcentajes de agente de entrecruzamiento, tres tipos de iniciadores radicalarios (2,2'-Azobis-2-metilpropionitrilo (AIBN), Óxido de 2,2,6,6-tetrametil piperidinio (TEMPO) y peróxido de benzoilo (PB)), distintos porcentajes de iniciador radicalario, diferentes temperaturas (50°C-120°C) y un surfactante (Tween 80, peso molecular elevado: 1310 g / mol).

- **Estudio de la superficie específica y porosidad:**

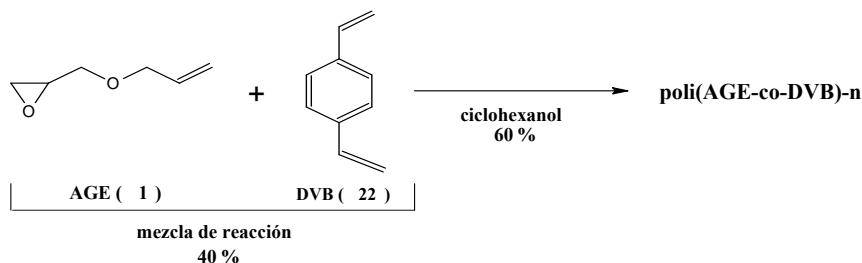
Los valores de superficie específica y tamaño de poro se determinaron por adsorción de nitrógeno a 77° K empleando el equipo TriStar (Micromeritics, U.S.). Las muestras se desgasificaron a 120° C durante 18 horas. Los valores de superficie específica se calcularon usando la ecuación BET<sup>506</sup> en el intervalo de presiones parciales de nitrógeno entre 0,05-0,35. Los valores de tamaño de poro se obtuvieron empleando isothermas de adsorción de nitrógeno de acuerdo con el método BJH.<sup>507, 508</sup>

### **5.3.1. Síntesis, superficie específica y porosidad de polímeros de alquioxiranos con agente de entrecruzamiento arílico.**

Siguiendo el Plan de Trabajo propuesto, se empieza por las reacciones de polimerización de los monómeros alquioxiranos. Las reacciones de polimerización de estos monómeros con los diferentes agentes de entrecruzamiento, únicamente han conducido a polímeros sólidos con el DVB (**22**), mientras que con el resto de los agentes de entrecruzamiento se han obtenido oligómeros de aspecto aceite-ceroso. Por tanto, pasamos a analizar las polimerizaciones de los alquioxiranos con diferente grado de funcionalización y DVB (**22**).

### 5.3.1.1.A. Síntesis, superficie específica y porosidad de los polímeros de AGE (1) con DVB (22): poli(AGE-co-DVB)-n.

Comenzamos las reacciones de polimerización con el monómero que presenta un grupo epóxido, es decir, el AGE (1) (Esquema 42).



**Esquema 42.** Síntesis de poli(AGE-co-DVB)-n.

El AGE (1) ha sido empleado como monómero, por numerosos grupos de investigación, en la síntesis de polímeros funcionalizados con grupos epóxido para la inmovilización de enzimas.<sup>383, 385, 509-513</sup> La gran mayoría de estos estudios previos se realizaron empleando, como agentes de entrecruzamiento (crosslinker), acrilatos ó metacrilatos. Sólo uno de los trabajos referenciados reporta la síntesis de poli(AGE-co-DVB) y lo emplean en la purificación de Penicilinas por cromatografía de afinidad.<sup>509</sup>

La mayoría de los estudios realizados para la obtención de polímeros porosos, parten de una mezcla de reacción del 40%, compuesta por monómero y crosslinker, y un 60% de disolvente porogénico.<sup>513, 514</sup> En estudios previos realizados por nosotros, también obtuvimos los mejores resultados con estas proporciones, por lo que en todas las reacciones de polimerización mantenemos estos porcentajes, aunque sí variaremos el resto de parámetros: proporción monómero-crosslinker, tipo y porcentaje de iniciador radicalario y temperatura de reacción.

La mezcla de reacción suele estar compuesta por un 60% de monómero y un 40% de crosslinker.<sup>513, 514</sup> Nosotros realizamos los primeros estudios con esta proporción y después, a tenor de los resultados, introduciremos modificaciones en este porcentaje.

El hecho de que nos hayamos visto obligados a utilizar el DVB (22) como agente de entrecruzamiento con los alquioxiranos, conlleva la dificultad de la gran diferencia de reactividad del DVB frente a los monómeros alquioxiranos en la reacción de polimerización radicalaria, con lo que se esperan rendimientos bajos. Con el fin de paliar, en lo posible, esta diferencia de reactividad, utilizamos el DVB con estabilizante y lo comparamos con el DVB sin estabilizante.

Con relación a los iniciadores radicalarios, emplearemos los típicos para este tipo de polimerizaciones: AIBN, PB y TEMPO, y unos porcentajes que suelen ir del 1% al 15%. Una variable que está estrechamente relacionada con los iniciadores radicalarios es la temperatura de reacción, ya que afecta a la vida media de los mismos. Por eso, hemos utilizado

un rango de temperaturas que va desde los 70°C a los 120°C, dependiendo de la naturaleza de los iniciadores radicalarios.

Así que, empezamos el estudio manteniendo constante la mezcla de reacción y variando, la naturaleza y porcentaje del iniciador radicalario, y la temperatura.

En la Tabla 5 aparecen los resultados obtenidos empleando el AIBN como iniciador radicalario. A tenor de estos resultados, podemos decir que los rendimientos son moderadamente bajos, como era de esperar, pero superan el 50% si se emplea DVB con estabilizante, a la vez que se mejoran las propiedades texturales de los polímeros sintetizados.

Con relación a la temperatura, puede verse que al trabajar con AIBN, los mejores resultados se obtienen a 70°C y 90°C, en concreto n= 8 con un 15% de AIBN a 70°C y n= 13 con un 1% de AIBN y 90°C, por lo que a mayor temperatura disminuye el porcentaje de AIBN que da lugar a los mejores resultados.

**Tabla 5.** Síntesis y propiedades texturales de los poli(AGE-co-DVB)-n. (n= 1-24)

Entrada (n)	Mezcla de reacción			Iniciador (%)	T <sup>a</sup> (°C)	Rto. (%)	Volumen del poro (cm <sup>3</sup> /g)	Tamaño de Poro (nm)	Superficie BET (m <sup>2</sup> /g)	R
	% monómero (AGE)	% crosslinker (DVB)								
		Sin estabilizante	Con estabilizante							
1	60	40		1% AIBN	70	45,4	1,21	10,0	537,5	0,02
2	60	40		5% AIBN	70	46,1	1,21	12,0	435,2	0,03
3	60	40		10% AIBN	70	48,4	0,45	7,3	274,5	0,03
4	60	40		15% AIBN	70	48,2	0,49	6,9	324,1	0,02
5	60		40	1% AIBN	70	43,1	1,51	9,2	746,6	0,01
6	60		40	5% AIBN	70	47,4	1,44	10,9	583,0	0,02
7	60		40	10% AIBN	70	50,4	1,42	11,8	470,4	0,03
8	60		40	15% AIBN	70	51,4	1,71	13,6	540,4	0,03
9	60	40		1% AIBN	90	40,5	0,89	7,8	516,2	0,02
10	60	40		5% AIBN	90	44,0	0,39	5,1	384,8	0,01
11	60	40		10% AIBN	90	45,3	0,02	7,1	11,7	0,61
12	60	40		15% AIBN	90	49,5	-	-	-	-
13	60		40	1% AIBN	90	55,6	2,09	11,5	794,5	0,01
14	60		40	5% AIBN	90	46,0	1,73	11,8	631,0	0,02
15	60		40	10% AIBN	90	48,5	1,09	9,5	511,0	0,02
16	60		40	15% AIBN	90	48,3	0,87	8,1	485,5	0,02
17	60	40		1% AIBN	120	47,1	0,24	5,1	230,9	0,02
18	60	40		5% AIBN	120	48,3	-	-	-	-
19	60	40		10% AIBN	120	50,1	-	-	-	-
20	60	40		15% AIBN	120	53,3	-	-	-	-
21	60		40	1% AIBN	120	47,4	1,41	10,3	594,9	0,02
22	60		40	5% AIBN	120	46,0	0,33	4,1	433,1	0,01
23	60		40	10% AIBN	120	53,5	-	-	-	-
24	60		40	15% AIBN	120	56,0	-	-	-	-

%: Expresa el porcentaje en peso.

Rto.: Rendimiento.

R: relación tamaño de poro/superficie específica.

- : Polímeros con una superficie menor a 1 m<sup>2</sup>/g.

A continuación se empleó el peróxido de benzoilo (PB) como iniciador radicalario, cuyos resultados se reflejan en la Tabla 6. Como se observa en esta Tabla, los mejores resultados también se han obtenido empleando DVB con estabilizante. Pero en este caso, la temperatura no fue tan crítica, obteniéndose buenos resultados con todas las temperaturas (n= 30 a 70°C, n= 37 a 90°C y n= 45 con 120°C). Aunque, en líneas generales, se puede decir, que se obtuvieron mejores resultados empleando AIBN como agente radicalario.

**Tabla 6.** Síntesis y propiedades texturales de los poli(AGE-co-DVB)-n. (n= 25-48)

Entrada (n)	Mezcla de reacción			Iniciador (%)	T <sup>a</sup> (°C)	Rto. (%)	Volumen del poro (cm <sup>3</sup> /g)	Tamaño de Poro (nm)	Superficie BET (m <sup>2</sup> /g)	R
	% monómero (AGE)	% crosslinker (DVB)								
		Sin estabilizante	Con estabilizante							
25	60	40		1% PB	70	38,3	1,25	10,5	531,7	0,02
26	60	40		5% PB	70	40,9	0,68	7,6	409,7	0,02
27	60	40		10% PB	70	48,3	0,73	6,8	509,5	0,01
28	60	40		15% PB	70	51,5	-	-	-	-
29	60		40	1% PB	70	42,5	1,51	9,2	741,7	0,01
30	60		40	5% PB	70	46,5	1,49	11,3	570,6	0,02
31	60		40	10% PB	70	48,6	0,17	7,0	112,7	0,06
32	60		40	15% PB	70	58,7	0,28	7,9	159,6	0,05
33	60	40		1% PB	90	42,0	0,45	5,6	390,7	0,01
34	60	40		5% PB	90	50,2	-	-	-	-
35	60	40		10% PB	90	53,1	-	-	-	-
36	60	40		15% PB	90	55,3	-	-	-	-
37	60		40	1% PB	90	41,5	2,05	10,2	890,9	0,01
38	60		40	5% PB	90	46,5	0,87	6,6	617,1	0,01
39	60		40	10% PB	90	56,7	0,03	6,0	23,8	0,25
40	60		40	15% PB	90	56,0	&	&	&	&
41	60	40		1% PB	120	49,5	0,11	5,5	100,6	0,05
42	60	40		5% PB	120	50,2	-	-	-	-
43	60	40		10% PB	120	54,0	0,01	42,0	1,2	35,00
44	60	40		15% PB	120	59,2	-	-	-	-
45	60		40	1% PB	120	53,3	1,35	11,5	502,8	0,02
46	60		40	5% PB	120	61,8	0,33	6,7	225,4	0,03
47	60		40	10% PB	120	59,3	-	-	-	-
48	60		40	15% PB	120	57,1	-	-	-	-

%: Expresa el porcentaje en peso.

Rto.: Rendimiento.

R: relación tamaño de poro/superficie específica.

- : Polímeros con una superficie menor a 1 m<sup>2</sup>/g.

Finalmente, se llevaron a cabo las polimerizaciones con TEMPO como iniciador radicalario, pero en esta ocasión, no se lograron obtener polímeros sólidos con ninguna de las variantes introducidas, por lo que a partir de ahora se descarta la utilización de este iniciador radicalario.

A continuación, introducimos variaciones en la proporción de la mezcla de reacción: monómero (50-90%) y crosslinker (50-10%), pero únicamente en aquellas condiciones de reacción que condujeron a los mejores resultados. Los resultados obtenidos en este estudio aparecen reflejados en la Tabla 7. Como se puede observar en esta Tabla, a medida que aumentamos el porcentaje de monómero frente al crosslinker, aumenta el tamaño de poro y disminuye la superficie específica, pero hay un límite, ya que a partir de un 80% de monómero, se obtienen polímeros no porosos, cuya superficie BET es inferior a 1m<sup>2</sup> / g.

Una vez analizados todos los resultados, podemos concluir que las condiciones más idóneas son aquellas en las que se emplea AIBN, a 70°C y con un porcentaje de monómero (AGE) que oscila entre el 60-80%. Concretamente las entradas n= 8, 58 y 68, y estas son las condiciones con las que probamos la última de las variables, el empleo de un agente surfactante (Tween 80), en un 30% respecto a la mezcla de reacción, que suelen ser las condiciones más usuales empleadas para la mejora de las propiedades texturales de los soportes.<sup>503-505</sup> Como podemos observar (entrada n= 73-75 de la Tabla 7), el uso del surfactante mejora las

propiedades texturales de los polímeros, siendo las condiciones empleadas en la entrada n= 74, las que dieron lugar a los mejores resultados.

**Tabla 7.** Síntesis y propiedades texturales de los poli(AGE-co-DVB)-n. (n= 49-75).

Entrada (n)	Mezcla de reacción		Iniciador (%)	T <sup>a</sup> (°C)	Rto. (%)	Volumen del poro (cm <sup>3</sup> /g)	Tamaño de Poro (nm)	Superficie BET (m <sup>2</sup> /g)	R
	% monómero (AGE)	% crosslinker (DVB) Sin estabilizante    Con estabilizante							
49	50	50	1% AIBN	70	55,3	1,34	11,9	489,4	0,02
50	50	50	5% AIBN	70	58,8	1,10	10,8	449,7	0,02
51	50	50	1% PB	70	44,8	1,42	8,7	749,4	0,01
52	50	50	5% PB	70	52,3	1,83	10,8	754,4	0,01
53	50	50	1% AIBN	90	51,2	1,62	9,2	790,8	0,01
54	50	50	5% AIBN	90	55,8	1,87	11,9	682,2	0,02
55	50	50	1% P.B.	90	49,0	1,68	9,8	765,2	0,01
56	50	50	1% P.B.	120	53,8	1,96	11,3	763,0	0,01
57	70	30	1% AIBN	70	31,8	1,65	9,4	804,4	0,01
58	70	30	5% AIBN	70	37,8	1,89	14,3	563,1	0,03
59	70	30	10% AIBN	70	39,5	2,08	13,5	482,5	0,03
60	70	30	15% AIBN	70	40,0	1,63	14,6	473,8	0,03
61	70	30	1% P.B.	70	31,3	1,67	9,7	774,8	0,01
62	70	30	5% P.B.	70	35,6	0,95	7,2	609,1	0,01
63	70	30	1% AIBN	90	34,4	1,82	11,3	709,2	0,02
64	70	30	5% AIBN	90	35,1	1,43	9,2	701,3	0,01
65	70	30	1% P.B.	90	26,8	1,46	8,5	773,9	0,01
66	70	30	1% P.B.	120	35,2	1,18	8,6	696,4	0,01
67	80	20	5% AIBN	70	26,5	1,78	14,3	530,3	0,03
68	80	20	10% AIBN	70	30,5	1,63	15,8	433,1	0,04
69	80	20	15% AIBN	70	30,1	0,91	13,0	295,4	0,04
70	90	10	5% AIBN	70	11,8	-	-	-	-
71	90	10	10% AIBN	70	11,4	-	-	-	-
72	90	10	15% AIBN	70	16,7	-	-	-	-
73*	60	40	15% AIBN	70	53,0	0,81	15,9	216,1	0,07
74*	70	30	5% AIBN	70	41,6	0,55	24,9	96,9	0,26
75*	80	20	10% AIBN	70	27,2	1,21	18,5	272,1	0,07

%: Expresa el porcentaje en peso.

Rto.: Rendimiento.

R: relación tamaño de poro/superficie específica.

- : Polímeros con una superficie menor a 1 m<sup>2</sup>/g.

\*: Se empleó un 30% de surfactante (Tween 80) respecto a la mezcla de reacción.

Por lo tanto, el poli(AGE-co-DVB)-74 es el polímero seleccionado de este grupo para llevar a cabo la inmovilización-estabilización de enzimas, pero antes, se lleva a cabo un estudio de la reproducibilidad del método de polimerización y la caracterización del mismo.

- **Estudio de reproducibilidad del método de polimerización.**

El estudio de reproducibilidad se llevó a cabo realizando 5 polimerizaciones en días diferentes, bajo las mismas condiciones, obteniéndose una elevada reproducibilidad del método de polimerización. En la Tabla 8 se muestran los resultados obtenidos en este estudio.

**Tabla 8.** Resultados obtenidos en el estudio de reproducibilidad del método de polimerización.

Polimerización	Rto. (%)	Volumen del poro (cm <sup>3</sup> /g)	Tamaño de poro (nm)	Superficie BET (m <sup>2</sup> /g)
1 <sup>a</sup>	41,6	0,55	24,9	96,9
2 <sup>a</sup>	41,3	0,52	25,2	95,1
3 <sup>a</sup>	42,0	0,58	24,1	98,6
4 <sup>a</sup>	41,5	0,56	24,6	97,2
5 <sup>a</sup>	41,8	0,61	23,8	99,3
Desviación estándar	0,2	0,03	0,5	1,5



### 5.3.1.1.B. Caracterización de poli(AGE-co-DVB)-74.

#### 1. Análisis y caracterización de los grupos epóxido.

Cuando sea posible determinar el grado de epoxidación de los polímeros por análisis elemental, es decir, cuando las funciones oxigenadas del polímero correspondan únicamente a los monómeros, se llevará a cabo el estudio del análisis elemental y se comparará con los resultados obtenidos mediante la valoración de grupos epóxido.<sup>570-572</sup>

##### a) Análisis elemental.

Poli(AGE-co-DVB)-74    C: 85.14%    H: 8.18%    O: 6.68%

##### b) Determinación del grado de epoxidación del polímero.

El grado de epoxidación determinado por el método de valoración<sup>570-572</sup> aparece reflejado en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Grado de epoxidación de poli(AGE-co-DVB)-74.

Polímero	Grado de epoxidación (mmol epóxido/g de polímero)		
	Teórico <sup>a</sup>	Análisis elemental	Valoración <sup>b</sup>
Poli(AGE-co-DVB)-74	6.13-1.05	2.00	2.04

<sup>a</sup> Calculado teniendo en cuenta la mezcla de reacción y el rendimiento de la polimerización.

<sup>b</sup> Titración con bromuro de tetraetil amonio y ácido perclórico en presencia de cristal violeta.

Como se observa en la Tabla 9, los valores obtenidos en el análisis elemental y en la valoración son prácticamente idénticos, y se encuentran en el margen teórico calculado teniendo en cuenta la mezcla y el rendimiento de la reacción.

##### c) Caracterización de grupos epóxido mediante espectroscopia de infrarrojo (ATR/FT-IR).

La presencia de grupos epóxido en el polímero, puede constatarse con el espectro de ATR. En la Figura 13, se muestra el espectro obtenido mediante ATR del polímero caracterizado. En el espectro se pueden observar las señales características de polímeros funcionalizados con grupos epóxido: una banda a 901 cm<sup>-1</sup> característica de la absorción por grupos epóxido, una banda a 1217 cm<sup>-1</sup> correspondiente a la vibración del grupo epóxido (banda de vibración C-O-C de un éter cíclico) y bandas a 1603, 1509 y 830 cm<sup>-1</sup> características de anillos aromáticos sustituidos en polímeros funcionalizados con grupos epóxido.

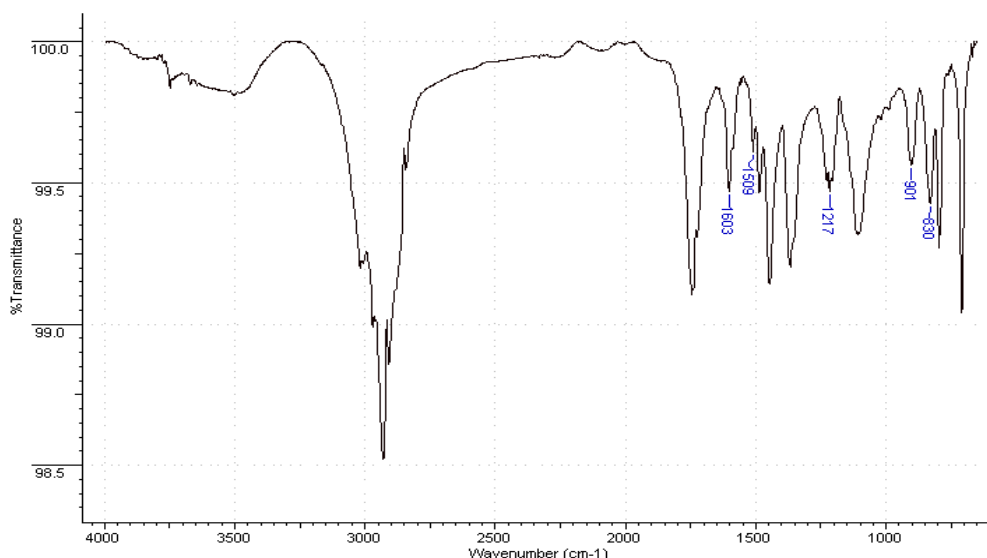


Figura 13. Espectro ATR del polímero poli(AGE-co-DVB)-74.

## 2. Comportamiento térmico: Análisis termogravimétrico (TGA).

El comportamiento térmico de los polímeros se estudio por análisis termogravimétrico (curva de peso). En la Figura 14, se puede observar el análisis termogravimétrico del polímero caracterizado. Dicho análisis muestra que este polímero presenta una excelente estabilidad térmica hasta los 190° C, más allá de esta temperatura el material comienza a descomponerse y su pérdida de peso se hace evidente.

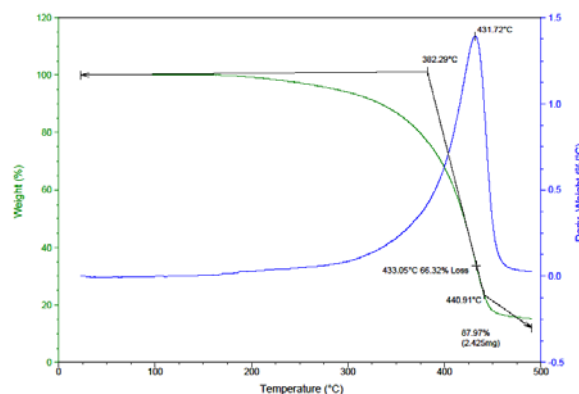


Figura 14. Análisis termogravimétrico del polímero poli(AGE-co-DVB)-74.

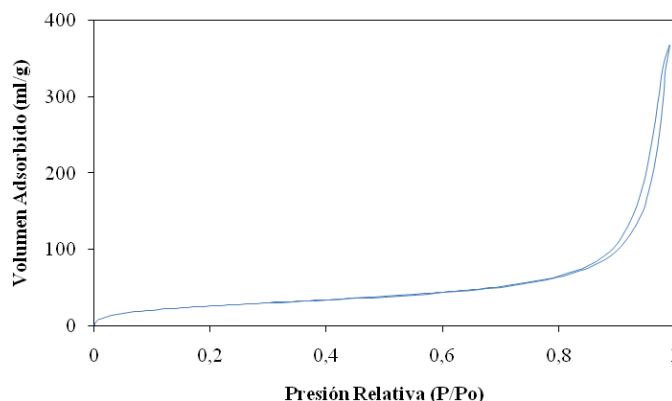
## 3. Caracterización textural.

Con las técnicas de adsorción-desorción de nitrógeno (empleando el método BJH<sup>507, 508</sup>) y microscopía electrónica de barrido y se determinaron las propiedades texturales de los polímeros sintetizados.

### a) Isotherma de adsorción-desorción de nitrógeno.

La isoterma de adsorción-desorción de nitrógeno de este polímero es de tipo IV según la clasificación BET,<sup>506</sup> característica de un material fundamentalmente mesoporoso con grandes mesoporos (tamaño de poro superior a 50 nm), en la que se observa un ciclo de histéresis

perteneciente al tipo H1, que se ha descrito en morfologías que tienen distribuciones de poro muy angostas o aglomerados de partículas esféricas de tamaños y distribuciones aproximadamente uniformes. La isoterma tipo IV se caracteriza por un incremento inicial de volumen adsorbido a bajas presiones, seguido de un incremento gradual y continuo que finaliza en un crecimiento exponencial cuando la presión relativa de nitrógeno ( $P/P_0$ ) es próxima a la unidad (Figura 15).

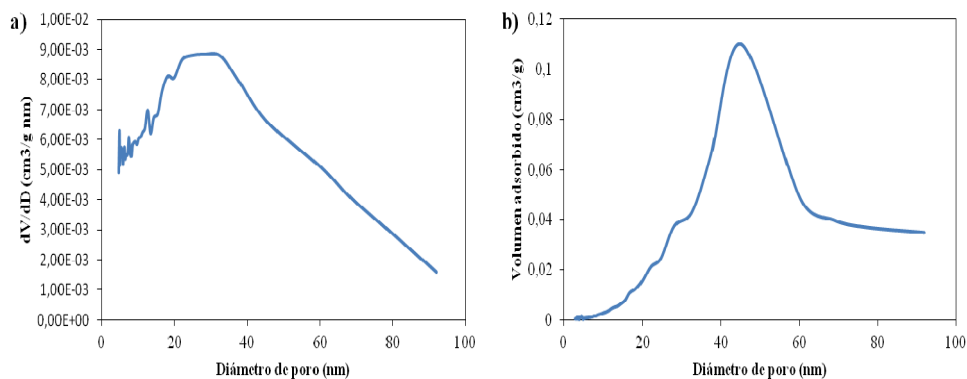


**Figura 15.** Isoterma de adsorción de nitrógeno del polímero poli (AGE-co-DVB)-74.

Las ramas de adsorción y desorción de la isoterma son paralelas y llegan a unirse aproximadamente en el punto donde comienza la zona intermedia lineal ( $P/P_0$ : 0.8  $\rightarrow$  Radio de poro mesoporoso ( $R_p$ ): 43.7 nm), presentando un pequeño ciclo de histéresis. Estos fenómenos de histéresis que aparecen en la zona de desorción de la multicapa están asociados a la condensación capilar en estructuras meso porosas.

### b) Distribución de poro.

En la Figura 16 se presenta la distribución de poro y en la Tabla 10 se representa la distribución del volumen de poro de este polímero. Como se puede observar, la presencia de mesoporos contribuye significativamente al volumen de poro del soporte, apareciendo mayoritariamente grandes mesoporos.



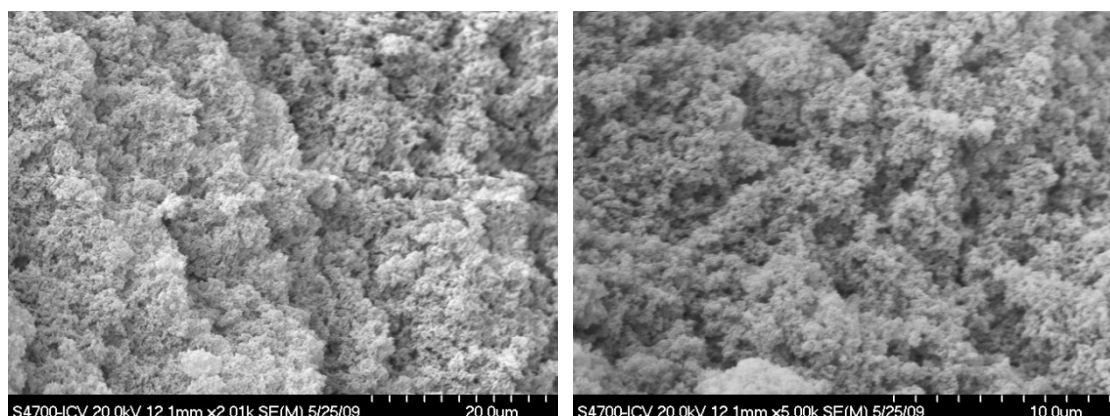
**Figura 16.** Distribución de tamaño de poro determinado a partir de los datos de adsorción empleando el método BJH.<sup>507, 508</sup> a) Distribución del tamaño de poro. b) Distribución del volumen de poro.

**Tabla 10.** Distribución del volumen de poro agrupando los poros por grupos de tamaño.

Diámetro (nm)	< 5	5-10	10-15	15-20	20-30	30-50	50-100	>100
Distribución del volumen de poro (%vol.)	3,32	4,52	5,35	5,73	9,43	20,30	34,21	17,13

### c) Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

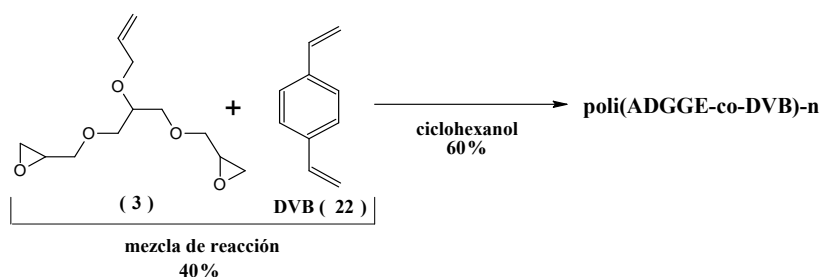
En la Figura 17 se muestran las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido del polímero poli(AGE-*co*-DVB)-74. La morfología encontrada es típica de agregados de partículas, con poros interconectados formados en el espacio interparticular.



**Figura 17.** Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido.

#### 5.3.1.2.A. Síntesis, superficie específica y porosidad de polímeros de 2-alil-1,3-diglicidil glicerol éter (ADGGE) (3) con DVB (22): poli(ADGGE-*co*-DVB)-n.

El siguiente monómero empleado en las reacciones de polimerización es aquél que presenta una estructura de alquioxirano con dos grupos epóxido, el con DVB es el 2-alil-1,3-diglicidil glicerol éter (ADGGE) (3) (Esquema 43).



**Esquema 43.** Síntesis de poli(ADGGE-*co*-DVB)-n.

Se empleó la misma metodología que en el apartado anterior, ya que los monómeros empleados, AGE y ADGGE, son referibles estructuralmente hablando, por tanto, no utilizamos

TEMPO como iniciador radicalario, pero si mantuvimos el mismo criterio, respecto al resto de variables.

Así pues, partimos de la mezcla de reacción compuesta por una 60% del monómero ADGGE (3) y 40% de crosslinker, DVB (22), empleando AIBN como iniciador radicalario, variando el porcentaje de iniciador radicalario y la temperatura empleada. Los resultados obtenidos en estas polimerizaciones aparecen en la Tabla 11.

Analizando los resultados obtenidos en esta polimerizaciones (Tabla 11), observamos que el monómero ADGGE (3) se comporta de forma muy similar al AGE (1), obteniéndose resultados bastante satisfactorios a 70°C y 90°C. Sin embargo, a 120°C da lugar a polímeros no porosos, con una superficie BET inferior a 1 m<sup>2</sup>/g, salvo en la entrada n=21.

Cuando las reacciones se llevan a cabo en presencia de peróxido de benzoilo (PB), Tabla 12, se obtienen peores resultados que con AIBN y, en líneas generales, se menos polímeros porosos que con el AGE (1).

En este caso, se obtienen resultados moderadamente satisfactorios a 70°C y bajos porcentajes de PB (1%-5%). En cualquier caso, los resultados son claramente peores que los obtenidos con AIBN.

**Tabla 11.** Síntesis y propiedades texturales de poli(ADGGE-co-DVB)-n (n= 1-24).

Entrada	Mezcla de reacción			Iniciador (%)	T <sup>a</sup> (°C)	R (%)	Volumen de poro (cm <sup>3</sup> /g)	Tamaño de poro (nm)	Superficie BET (m <sup>2</sup> /g)	R
	% ADGGE	% crosslinker (DVB)								
		Sin estabilizante	Con estabilizante							
1	60	40		1% AIBN	70	50,5	0,75	21,6	139,0	0,16
2	60	40		5% AIBN	70	41,8	0,84	21,7	154,9	0,14
3	60	40		10% AIBN	70	48,4	0,90	21,6	167,0	0,13
4	60	40		15% AIBN	70	48,4	1,10	20,9	209,7	0,10
5	60		40	1% AIBN	70	50,1	0,91	16,1	250,6	0,06
6	60		40	5% AIBN	70	50,0	0,81	20,9	153,8	0,14
7	60		40	10% AIBN	70	55,6	0,87	22,0	157,7	0,14
8	60		40	15% AIBN	70	56,0	1,04	19,8	209,7	0,09
9	60	40		1% AIBN	90	49,4	0,66	18,8	133,6	0,14
10	60	40		5% AIBN	90	47,8	1,20	17,5	273,6	0,06
11	60	40		10% AIBN	90	56,4	0,74	20,9	144,6	0,14
12	60	40		15% AIBN	90	45,2	0,52	8,2	255,0	0,03
13	60		40	1% AIBN	90	49,7	0,92	16,0	243,7	0,07
14	60		40	5% AIBN	90	64,2	0,90	25,9	137,9	0,19
15	60		40	10% AIBN	90	56,5	1,48	20,2	293,3	0,07
16	60		40	15% AIBN	90	57,2	1,04	17,9	232,2	0,08
17	60	40		1% AIBN	120	59,3	0,35	18,2	77,7	0,23
18	60	40		5% AIBN	120	56,0	-	-	-	-
19	60	40		10% AIBN	120	61,4	-	-	-	-
20	60	40		15% AIBN	120	66,5	-	-	-	-
21	60		40	1% AIBN	120	60,0	1,28	20,3	236,1	0,09
22	60		40	5% AIBN	120	62,0	-	-	-	-
23	60		40	10% AIBN	120	52,0	-	-	-	-
24	60		40	15% AIBN	120	58,0	-	-	-	-

%: Expresa el porcentaje en peso.

**Rto.:** Rendimiento.

**R:** relación tamaño de poro/superficie específica.

- : Polímeros con una superficie menor a 1 m<sup>2</sup>/g.

**Tabla 12.** Síntesis y propiedades texturales de poli(ADGGE-co-DVB)-n (n= 25-48).

Entrada	Mezcla de reacción		Iniciador (%)	T <sup>a</sup> (°C)	R (%)	Volumen de poro (cm <sup>3</sup> /g)	Tamaño de poro (nm)	Superficie BET (m <sup>2</sup> /g)	R	
	% ADGGE	% crosslinker (DVB)								
		Sin estabilizante								Con estabilizante
25	60	40	1% PB	70	57,9	0,55	19,3	112,8	0,17	
26	60	40	5% PB	70	59,4	-	-	-	-	
27	60	40	10% PB	70	78,8	-	-	-	-	
28	60	40	15% PB	70	79,6	-	-	-	-	
29	60		1% PB	70	54,5	0,64	17,0	151,0	0,11	
30	60		5% PB	70	53,9	0,70	15,4	200,7	0,08	
31	60		10% PB	70	59,8	0,82	14,4	227,5	0,06	
32	60		15% PB	70	67,3	0,16	9,7	66,0	0,15	
33	60	40	1% PB	90	50,0	0,50	17,6	112,2	0,16	
34	60	40	5% PB	90	58,5	-	-	-	-	
35	60	40	10% PB	90	77,8	-	-	-	-	
36	60	40	15% PB	90	72,6	-	-	-	-	
37	60		1% PB	90	49,8	-	-	-	-	
38	60		5% PB	90	55,0	-	-	-	-	
39	60		10% PB	90	75,0	-	-	-	-	
40	60		15% PB	90	77,2	-	-	-	-	
41	60	40	1% PB	120	65,3	0,11	9,3	48,1	0,19	
42	60	40	5% PB	120	78,0	-	-	-	-	
43	60	40	10% PB	120	67,8	-	-	-	-	
44	60	40	15% PB	120	75,6	-	-	-	-	
45	60		1% PB	120	63,0	-	-	-	-	
46	60		5% PB	120	76,3	-	-	-	-	
47	60		10% PB	120	89,5	-	-	-	-	
48	60		15% PB	120	80,0	-	-	-	-	

%: Expresa el porcentaje en peso.

Rto.: Rendimiento.

R: relación tamaño de poro/superficie específica.

- : Polímeros con una superficie menor a 1 m<sup>2</sup>/g.

Dado que los mejores resultados corresponden a la entrada n= 14, es decir, empleando DVB con estabilizante, AIBN (5%) y 90°C, llevaremos a cabo modificaciones en los porcentajes de la mezcla de reacción y la introducción de un agente surfactante, bajo estas condiciones. Los resultados obtenidos aparecen en la Tabla 13.

Con las modificaciones introducidas en la mezcla de reacción, se logra mejorar los resultados, especialmente, los concernientes a la entrada n= 50. Sin embargo, en esta ocasión, el empleo del surfactante (entradas n= 53-55) no mejoró los resultados obtenidos sin él.

**Tabla 13.** Síntesis y propiedades texturales de poli(ADGGE-co-DVB)-n (n= 49-55).

Entrada	Mezcla de reacción		Iniciador (%)	T <sup>a</sup> (°C)	R (%)	Volumen de poro (cm <sup>3</sup> /g)	Tamaño de poro (nm)	Superficie BET (m <sup>2</sup> /g)	R
	% ADGGE	% crosslinker (DVB Con estabilizante)							
49	70	30	5% AIBN	90	36,8	1,50	18,6	232,4	0,08
50	70	30	10% AIBN	90	41,7	1,58	26,1	242,1	0,11
51	80	20	5% AIBN	90	21,7	1,51	20,5	280,9	0,07
52	80	20	10% AIBN	90	24,9	1,20	17,4	275,2	0,06
53*	60	40	10% AIBN	70	52,3	0,80	19,8	177,7	0,11
54*	60	40	5% AIBN	90	67,6	0,83	20,0	167,3	0,12

%: Expresa el porcentaje en peso.

Rto.: Rendimiento.

R: relación tamaño de poro/superficie específica.

- : Polímeros con una superficie menor a 1 m<sup>2</sup>/g.

\*: Se empleó un 30% de surfactante (Tween 80) respecto a la mezcla de reacción.

Como conclusión, podemos decir que:

- a) En la mayoría de los casos, el empleo de DVB con estabilizante, conduce a mejores rendimientos en la reacción de polimerización, y a unas mejores propiedades texturales de los polímeros.
- b) Lo mejores resultados se obtienen utilizando AIBN (5%-10%) como iniciador radicalario. En este caso, el PB conduce, en la mayoría de los casos, a polímeros no porosos, con una superficie específica inferior a  $1\text{m}^2 / \text{g}$ .
- c) La temperatura de reacción óptima está en torno a los  $70^{\circ}\text{C}$ - $90^{\circ}\text{C}$ ; mientras que a  $120^{\circ}\text{C}$  conduce, en la mayoría de los casos, a polímeros no porosos, ya que la velocidad de polimerización es tan elevada que no da tiempo a controlar el crecimiento de las cadenas poliméricas y es fundamental que el crecimiento de las cadenas sea lento para obtener soportes porosos.

Una vez analizadas todos los resultados, consideramos que el polímero que presentó mejores propiedades texturales es el poli(ADGGE-co-DVB)-50, por lo que a continuación se llevó a cabo un estudio de reproducibilidad de la técnica de polimerización y su caracterización.

- **Estudio de reproducibilidad del método de polimerización.**

El estudio de reproducibilidad se llevó a cabo realizando 5 polimerizaciones en días diferentes, bajo las mismas condiciones, obteniéndose una elevada reproducibilidad del método de polimerización. En la Tabla 14 se muestran los resultados obtenidos en este estudio.

**Tabla 14.** Resultados obtenidos en el estudio de reproducibilidad de la técnica de polimerización.

Polimerización	Rto. (%)	Volumen de poro ( $\text{cm}^3/\text{g}$ )	Tamaño de poro (nm)	Superficie BET ( $\text{m}^2/\text{g}$ )
1 <sup>a</sup>	41,5	1,58	26,1	242,1
2 <sup>a</sup>	42,1	1,46	25,8	244,6
3 <sup>a</sup>	41,7	1,61	27,0	239,9
4 <sup>a</sup>	40,3	1,55	24,3	245,3
5 <sup>a</sup>	42,8	1,72	26,4	242,8
<b>Desviación estándar</b>	0,8	0,08	0,9	1,9

%: Expresa el porcentaje en peso.

Rto.: Rendimiento.

### 5.3.1.2.B. Caracterización de poli(ADGGE-co-DVB)-50.

#### 1. Análisis y caracterización de los grupos epóxido.

##### a) Análisis elemental.

Poli(ADGGE-co-DVB)-50 C: 83.95% H: 7.85% O: 8.20%

### b) Determinación del grado de epoxidación del polímero.

El grado de epoxidación determinado por el método de valoración <sup>570-572</sup> aparece reflejado en la Tabla 15.

**Tabla 15.** Grado de epoxidación de poli(ADGGE-co-DVB)-50.

Polímero	Grado de epoxidación (mmol epóxido/g de polímero)		
	Teórico <sup>a</sup>	Análisis elemental	Valoración <sup>b</sup>
<b>Poli(ADGGE-co-DVB)-50</b>	4.91-1.98	2.10	2.15

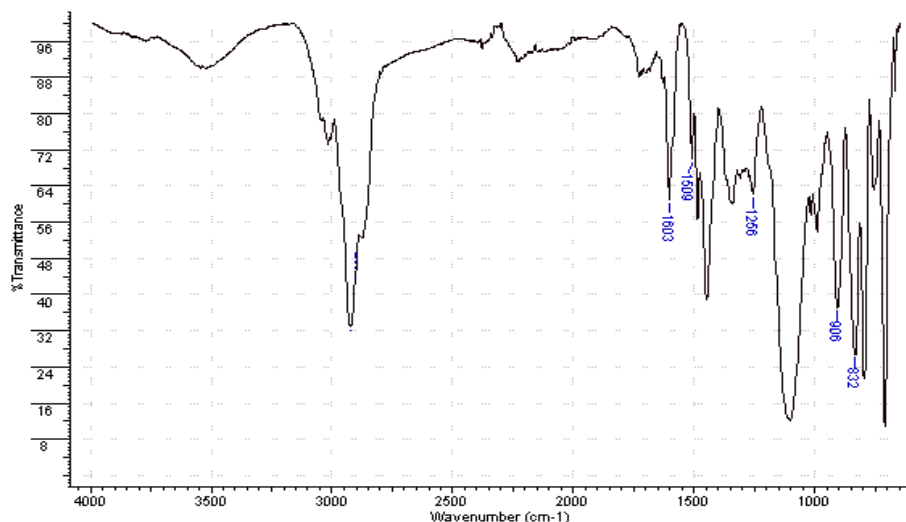
<sup>a</sup> Calculado teniendo en cuenta la mezcla de reacción y el rendimiento de la polimerización.

<sup>b</sup> Titración con bromuro de tetraetil amonio y ácido perclórico en presencia de cristal violeta.

Como se observa en la Tabla 15, los valores obtenidos en el análisis elemental y en la valoración son muy similares, y se encuentran en el margen teórico calculado teniendo en cuenta la mezcla y el rendimiento de la reacción.

### c) Caracterización de grupos epóxido mediante espectroscopia de infrarrojo (ATR/FT-IR).

En la Figura 18 se muestra el espectro obtenido mediante ATR del polímero caracterizado. En el espectro se pueden observar señales características de polímeros funcionalizados con grupos epóxido: una banda a 906 cm<sup>-1</sup> característica de la absorción por grupos epóxido, una banda a 1256 cm<sup>-1</sup> correspondiente a la vibración del grupo epóxido (banda de vibración C-O-C de un éter cíclico) y bandas a 1603, 1509 y 832 cm<sup>-1</sup> características de anillos aromáticos sustituidos en polímeros funcionalizados con grupos epóxido.



**Figura 18.** Espectro ATR del polímero poli(ADGGE-co-DVB)-50.



## 2. Comportamiento térmico: Análisis termogravimétrico (TGA).

En la Figura 19, se puede observar el análisis termogravimétrico del polímero caracterizado. Dicho análisis muestra que este polímero presenta una excelente estabilidad térmica hasta los 185° C, más allá de esta temperatura el material comienza a descomponerse y su pérdida de peso se hace evidente.

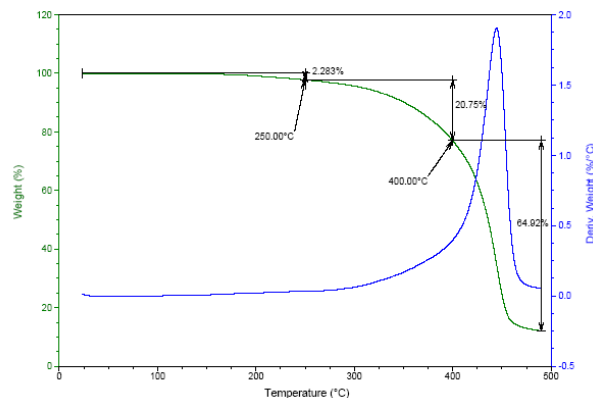


Figura 19. Análisis termogravimétrico del polímero poli(ADGGE-co-DVB)-50.

## 3. Caracterización textural.

Con las técnicas de adsorción-desorción de nitrógeno (empleando el método BJH <sup>507, 508</sup>) y microscopía electrónica de barrido se determinaron las propiedades texturales de los polímeros sintetizados.

### a) Isotherma de adsorción-desorción de nitrógeno.

La isoterma de adsorción-desorción de nitrógeno de este polímero es de tipo IV según la clasificación BET, <sup>506</sup> anteriormente mencionada, en la que se observa un ciclo de histéresis perteneciente al tipo H1, que se ha descrito en morfologías que tienen distribuciones de poro muy angostas o aglomerados de partículas esféricas de tamaños y distribuciones aproximadamente uniformes (Figura 20).

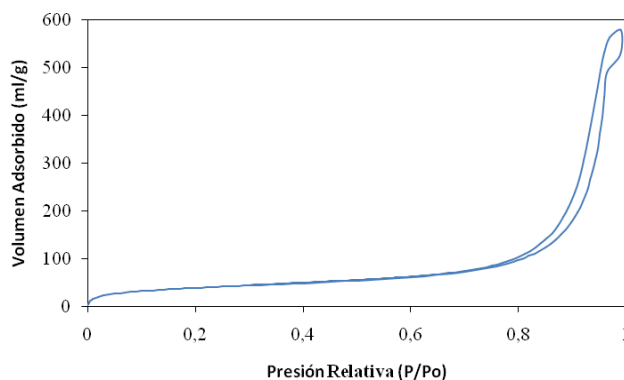


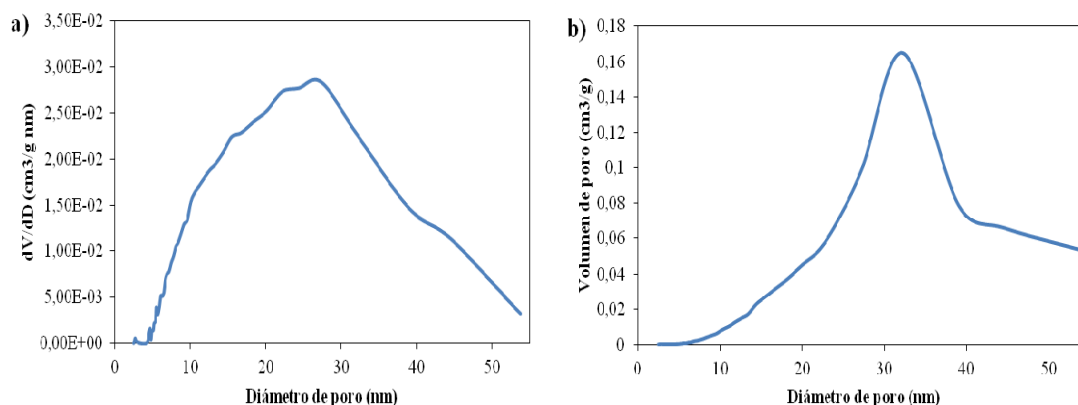
Figura 20. Isotherma de adsorción de nitrógeno del polímero poli(ADGGE-co-DVB)-50.

Las ramas de adsorción y desorción de la isoterma son paralelas y llegan a unirse aproximadamente en el punto donde comienza la zona intermedia lineal ( $P/P_o: 0.75 \rightarrow$  Radio de

poro mesoporoso: 34 nm), presentando un pequeño ciclo de histéresis. Estos fenómenos de histéresis que aparecen en la zona de desorción de la multicapa están asociados a la condensación capilar en estructuras mesoporosas.

**b) Distribución de poro.**

En la Figura 21 se presenta la distribución de poro y en la Tabla 16 se representa la distribución del volumen de poro de este polímero. Como se puede observar, este polímero es mayoritariamente mesoporoso y la presencia de mesoporos de gran tamaño contribuye significativamente al volumen de poro del soporte.



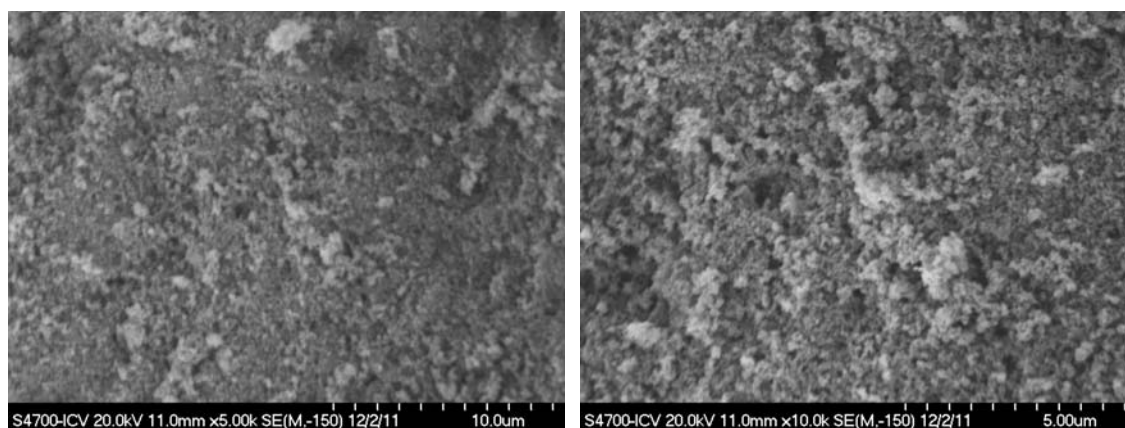
**Figura 21.** Distribución de tamaño de poro determinado a partir de los datos de adsorción empleando el método BJH.<sup>507, 508</sup> a) Distribución del tamaño de poro. b) Distribución del volumen de poro.

**Tabla 16.** Distribución del volumen de poro agrupando los poros por grupos de tamaño.

Diámetro (nm)	< 5	5-10	10-15	15-20	20-30	30-50	50-100	>100
Distribución del volumen de poro (%vol.)	1,07	4,53	7,85	7,12	17,52	34,86	13,92	13,13

**c) Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).**

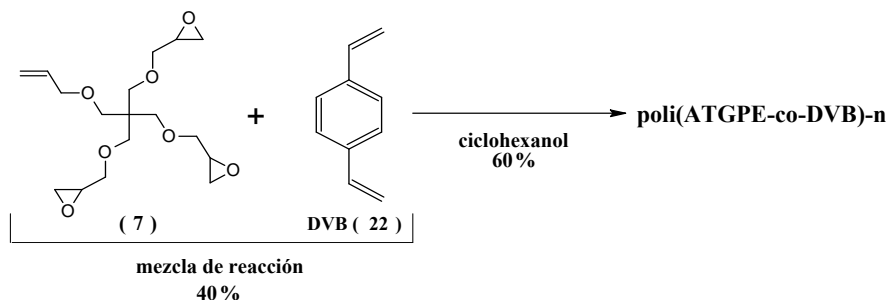
En la Figura 22 se muestran las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido del polímero poli(ADGGE-co-DVB)-50. La morfología encontrada es típica de agregados de partículas, con poros interconectados formados en el espacio interparticular.



**Figura 22.** Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido.

### 5.3.1.3.A. Síntesis, superficie específica y porosidad de los polímeros de alil triglicidil pentaeritritol éter (ATGPE) (7) con DVB: poli(ATGPE-co-DVB)-n.

Finalmente, se llevó a cabo las polimerizaciones con el monómero alquioxirano que presenta tres grupos epóxido, el alil triglicidil pentaeritritol éter (ATGPE) (7) (Esquema 44). El compuesto 7 ha sido previamente reportado y empleado como intermedio en la síntesis de resinas epoxi.<sup>483</sup>



**Esquema 44.** Síntesis de poli(ATGPE-co-DVB)-n.

Apoyados en los resultados anteriores, se optó por utilizar únicamente DVB con estabilizante y unos porcentajes de iniciador radicalario entre 1% y 10%. Los resultados obtenidos en estas polimerizaciones aparecen reflejados en la Tabla 17.

**Tabla 17.** Síntesis y propiedades texturales de poli(ATGPE-co-DVB)-n (n= 1-24).

Entrada (n)	Mezcla de reacción		Iniciador (%)	T <sup>a</sup> (°C)	Rto. (%)	Volumen de poro (cm <sup>3</sup> /g)	Tamaño de poro (nm)	Superficie BET (m <sup>2</sup> /g)	R
	% ATGPE	% DVB con estabilizante							
1	60	40	1% AIBN	70	50,4	0,83	16,7	197,1	0,08
2	60	40	5% AIBN	70	53,0	0,75	18,6	161,9	0,11
3	60	40	10% AIBN	70	50,1	1,06	14,9	284,3	0,05
4	60	40	1% P.B.	70	41,7	1,44	13,8	415,0	0,03
5	60	40	5% P.B.	70	49,4	1,70	16,5	410,8	0,04
6	60	40	10% P.B.	70	56,0	0,72	17,4	166,4	0,10
7	60	40	1% AIBN	90	48,3	1,10	17,1	255,6	0,07
8	60	40	5% AIBN	90	47,3	1,16	14,0	351,1	0,04
9	60	40	10% AIBN	90	46,4	1,61	14,8	739,4	0,02
10	60	40	1% P.B.	90	57,8	0,79	17,4	190,1	0,09
11	60	40	5% P.B.	90	47,9	1,13	15,6	303,5	0,05
12	60	40	10% P.B.	90	54,5	0,43	7,7	299,8	0,03
13	60	40	1% AIBN	120	54,7	1,22	24,2	207,7	0,12
14	60	40	5% AIBN	120	55,1	0,87	12,7	286,3	0,04
15	60	40	10% AIBN	120	61,7	0,22	8,1	118,7	0,07
16	60	40	1% P.B.	120	58,0	0,82	18,1	186,9	0,10
17	60	40	5% P.B.	120	70,3	0,10	8,6	47,2	0,18
18	60	40	10% P.B.	120	82,2	0,01	6,9	5,0	1,38
19	70	30	5% AIBN	70	52,1	0,80	19,3	154,6	0,12
20	70	30	1% AIBN	120	54,5	1,02	20,4	220,4	0,09
21	70	30	1% P.B.	120	57,6	0,79	19,2	167,7	0,11
22*	60	40	5% AIBN	70	54,2	0,65	18,9	158,6	0,12
23*	60	40	1% AIBN	120	55,9	1,50	19,8	243,2	0,08
24*	60	40	1% P.B.	120	58,6	0,70	18,6	183,5	0,10

**Rto.:** Rendimiento. %: Expresa el porcentaje en peso.

**R:** relación tamaño de poro/superficie específica.

\*Se empleo el 30% de surfactante (Tween 80) respecto a la mezcla de reacción.

Analizando en detalle los resultados obtenidos en estas polimerizaciones, se pueden destacar las siguientes conclusiones:

- En este caso, no se mejora el tamaño de poro al aumentar la proporción de monómero respecto al crosslinker, en la mezcla de reacción, obteniéndose los mejores resultados con la proporción inicial 60% monómero-40% crosslinker.
- Respecto al iniciador radicalario, se confirma, como en el caso anterior, que el AIBN (1%-5%), es el iniciador que conduce a los mejores resultados.
- Sin embargo, en lo referente a la temperatura de polimerización, el comportamiento ha sido distinto a los casos anteriores, obteniéndose buenos resultados a 120°C.
- El empleo de un surfactante (entradas n= 22-24) no mejora las propiedades texturales de los polímeros.

De todos los polímeros obtenidos con el monómero ATGPE (13), el que presenta mejores propiedades texturales es el que corresponde a la entrada n= 13, por lo que a continuación pasamos a detallar, los resultados obtenidos en el estudio de reproducibilidad del método de polimerización, y la caracterización del poli(ATGPE-co-DVB)-13.

- **Estudio de reproducibilidad del método de polimerización.**

El estudio de reproducibilidad se llevó a cabo realizando 5 polimerizaciones en días diferentes, bajo las mismas condiciones, obteniéndose una elevada reproducibilidad del método de polimerización. En la Tabla 18 se muestran los resultados obtenidos en este estudio.

**Tabla 18.** Resultados obtenidos en el estudio de reproducibilidad del método de polimerización.

Polimerizaciones	Rto. (%)	Volumen de poro (cm <sup>3</sup> /g)	Tamaño de poro (nm)	Superficie BET (m <sup>2</sup> /g)
1 <sup>a</sup>	54,7	1,22	24,2	207,7
2 <sup>a</sup>	53,8	1,19	25,3	202,5
3 <sup>a</sup>	54,5	1,31	23,6	210,9
4 <sup>a</sup>	55,1	1,3	23,8	209,1
5 <sup>a</sup>	52,8	1,43	22,9	215,7
<b>Desviación estándar</b>	0,8	0,08	0,8	4,3

Rto.: Rendimiento de la polimerización.

%: Representa el porcentaje en peso.

### 5.3.1.3.B. Caracterización de poli(ATGPE-co-DVB)-13.

#### 1. Análisis y caracterización de los grupos epóxido.

##### a) Análisis elemental.

Poli(ATGPE-co-DVB)-13 C: 87.68% H: 8.03% O: 4.29%

### b) Determinación del grado de epoxidación del polímero.

Como se observa en la Tabla 19, los valores obtenidos en el análisis elemental y en la valoración son muy similares, y se encuentran en el margen teórico calculado teniendo en cuenta la mezcla y el rendimiento de la reacción.

**Tabla 19.** Grado de epoxidación de poli(ATGPE-co-DVB)-13.

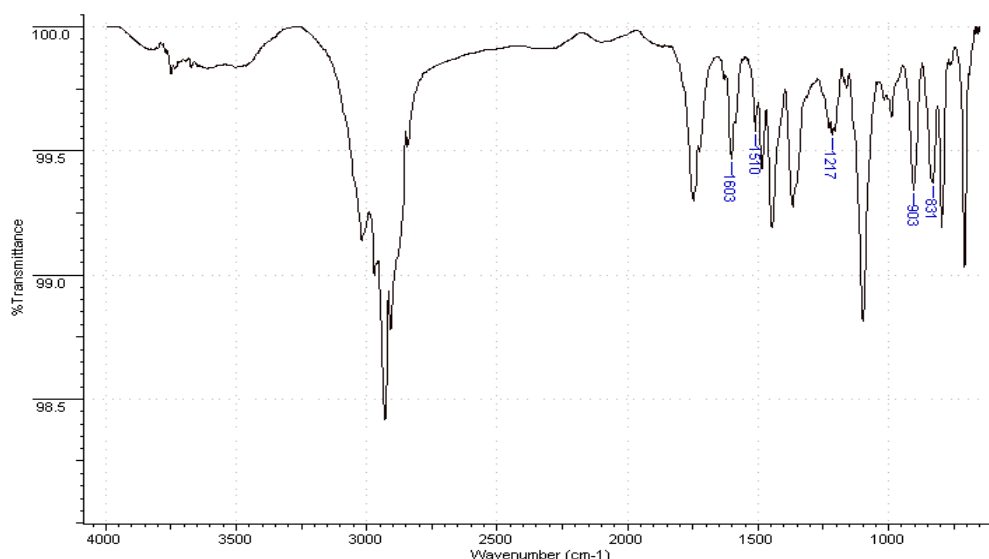
Polímero	Grado de epoxidación (mmol epóxido/g de polímero)		
	Teórico <sup>a</sup>	Análisis elemental	Valoración <sup>b</sup>
<b>Poli(ATGPE-co-DVB)-13</b>	5.20-1.13	1.15	1.21

<sup>a</sup> Calculado teniendo en cuenta la mezcla de reacción y el rendimiento de la polimerización.

<sup>b</sup> Titración con bromuro de tetraetil amonio y ácido perclórico en presencia de cristal violeta.

### c) Caracterización de grupos epóxido mediante espectroscopia de infrarrojo (ATR/FT-IR).

En la Figura 23 se muestra el espectro obtenido mediante ATR del polímero caracterizado. En el espectro se pueden observar las señales características de polímeros funcionalizados con grupos epóxido: una banda a 906  $\text{cm}^{-1}$  característica de la absorción por grupos epóxido, una banda a 1217  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a la vibración del grupo epóxido (banda de vibración C-O-C de un éter cíclico) y bandas a 1603, 1510 y 831  $\text{cm}^{-1}$  características de anillos aromáticos sustituidos en polímeros funcionalizados con grupos epóxido.

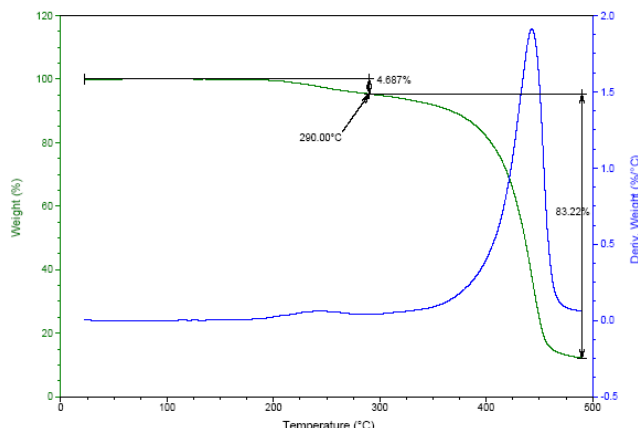


**Figura 23.** Espectro ATR del polímero poli(ATGPE-co-DVB)-13.

## 2. Comportamiento térmico: Análisis termogravimétrico (TGA).

En la Figura 24, se puede observar el análisis termogravimétrico del polímero caracterizado. Dicho análisis muestra que este polímero presenta una excelente estabilidad

térmica hasta los 200° C, más allá de esta temperatura el material comienza a descomponerse y su pérdida de peso se hace evidente.



**Figura 24.** Análisis termogravimétrico del polímero poli(ATGPE-co-DVB)-13.

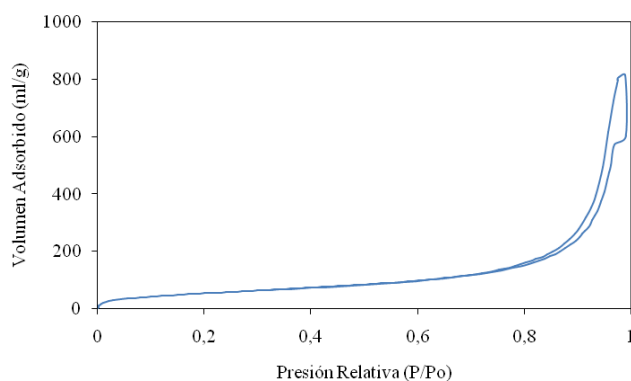
### 3. Caracterización textural.

Con las técnicas de adsorción-desorción de nitrógeno (empleando el método BJH <sup>507, 508</sup>) y microscopía electrónica de barrido se determinaron las propiedades texturales de los polímeros sintetizados.

#### a) Isotherma de adsorción-desorción de nitrógeno.

La isoterma de adsorción-desorción de nitrógeno de este polímero es de tipo IV según la clasificación BET, <sup>506</sup> anteriormente mencionada, en la que se observa un ciclo de histéresis perteneciente al tipo H1, que se ha descrito en morfologías que tienen distribuciones de poro muy angostas o aglomerados de partículas esféricas de tamaños y distribuciones aproximadamente uniformes (Figura 25).

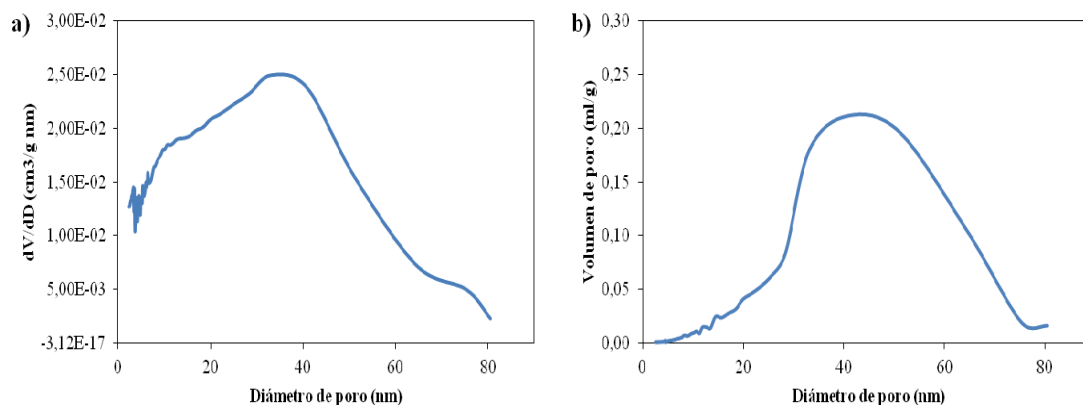
Las ramas de adsorción y desorción de la isoterma son paralelas y llegan a unirse aproximadamente en el punto donde comienza la zona intermedia lineal (P/Po: 0.78 → Volumen de poro mesoporoso: 39 nm), presentando un pequeño ciclo de histéresis. Estos fenómenos de histéresis que aparecen en la zona de desorción de la multicapa están asociados a la condensación capilar en estructuras mesoporosas.



**Figura 25.** Isotherma de adsorción de nitrógeno del polímero poli(ATGPE-co-DVB)-13.

**b) Distribución de poro.**

En la Figura 26 se presenta la distribución de poro y en la Tabla 20 se representa la distribución del volumen de poro de este polímero. Como se puede observar este polímero es mayoritariamente mesoporoso, y la presencia de mesoporos de gran tamaño contribuyen significativamente al volumen de poro del soporte.



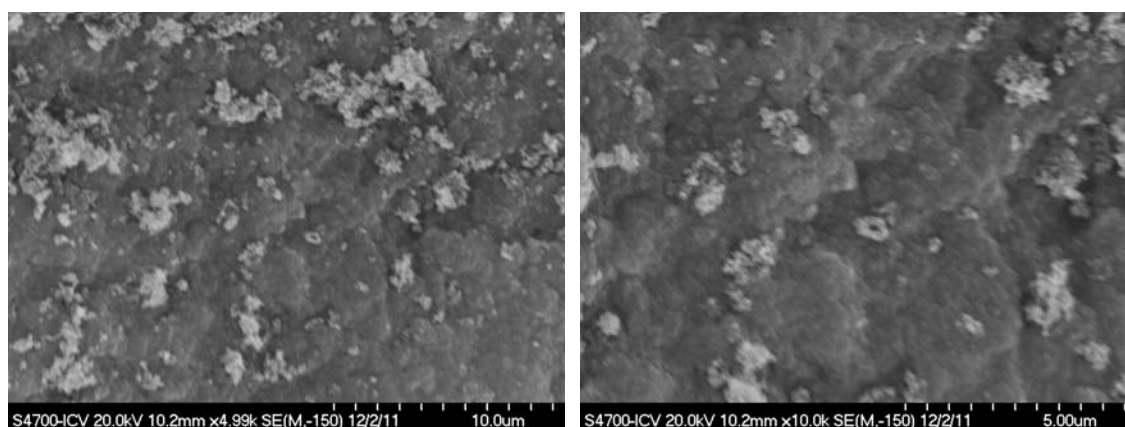
**Figura 26.** Distribución de tamaño de poro determinado a partir de los datos de adsorción empleando el método BJH.<sup>507, 508</sup> a) Distribución del tamaño de poro. b) Distribución del volumen de poro.

**Tabla 20.** Distribución del volumen de poro agrupando los poros por grupos de tamaño.

Diámetro (nm)	< 5	5-10	10-15	15-20	20-30	30-50	50-100	>100
Distribución del volumen de poro (%vol.)	3,59	5,47	6,41	6,77	9,96	21,04	24,63	22,13

**c) Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).**

En la Figura 27 se muestran las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido del polímero poli(ATGPE-co-DVB)-13. La morfología encontrada es típica de agregados de partículas, con poros interconectados formados en el espacio interparticular.



**Figura 27.** Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido.





iniciador radicalario, empleando temperaturas de 70°C y 90°C (Esquema 45). Los resultados obtenidos en estas polimerizaciones aparecen reflejados en la Tabla 21.

**Tabla 21.** Síntesis y propiedades texturales de poli(AGE-co-DAPE-DVB)-n (n=1-20).

Entrada (n)	Mezcla de reacción			Iniciador (%)	T <sup>a</sup> (°C)	Rto. (%)	Volumen de poro (cm <sup>3</sup> /g)	Tamaño de poro (nm)	Superficie BET (m <sup>2</sup> /g)	R
	% AGE	% crosslinker (19)	% crosslinker (DVB)							
1	50	25	25	1% AIBN	70	30,8	1,19	12,0	428,4	0,03
2	50	25	25	5% AIBN	70	36,2	1,13	16,6	283,2	0,06
3	50	25	25	10% AIBN	70	34,6	1,18	17,3	284,8	0,06
4	50	25	25	15% AIBN	70	33,7	1,60	19,9	333,1	0,06
5	50	25	25	1% AIBN	90	49,8	0,86	17,7	204,4	0,09
6	50	25	25	5% AIBN	90	47,4	0,18	16,0	45,6	0,35
7	50	25	25	10% AIBN	90	42,0	0,08	40,4	8,3	4,87
8	60	20	20	5% AIBN	70	27,7	2,10	15,6	604,4	0,03
9	60	20	20	10% AIBN	70	28,4	1,66	17,9	389,6	0,05
10	60	20	20	15% AIBN	70	26,4	2,04	18,9	431,2	0,04
11	60	20	20	1% AIBN	90	24,2	1,45	12,3	494,8	0,02
12	70	10	20	5% AIBN	70	23,8	1,74	16,8	488,9	0,03
13	70	10	20	10% AIBN	70	26,7	2,00	18,4	467,2	0,04
14	70	10	20	15% AIBN	70	28,9	1,22	14,3	325,8	0,04
15	70	10	20	1% AIBN	90	22,7	1,36	9,2	660,5	0,01
16*	50	25	25	15% AIBN	70	38,8	0,58	17,1	142,6	0,12
17*	60	20	20	10% AIBN	70	27,4	1,14	18,8	251,5	0,07
18*	60	20	20	15% AIBN	70	29,3	0,90	18,6	201,4	0,09
19*	70	10	20	5% AIBN	70	28,5	1,09	17,1	266,4	0,06
20*	70	10	20	10% AIBN	70	27,8	1,07	17,2	260,9	0,07

%: Expresa el porcentaje en peso.

**Rto.:** Rendimiento.

**R:** Relación tamaño de poro/superficie específica.

\*Se empleo 30% surfactante (Tween 80) respecto a la mezcla de reacción.

Se comenzó con las polimerizaciones empleando una mezcla de reacción compuesta por el 50% de monómero y el 50% de mezcla de crosslinker, a una temperatura de 70°C y un porcentaje variable de AIBN (n= 1-4). Aunque los rendimientos son bajos (30-38%), se observa que según se aumenta el porcentaje de iniciador radicalario mejoran las propiedades texturales de los polímeros, obteniéndose el mejor resultado con un 15% de AIBN.

Manteniendo las mismas condiciones de reacción y aumentando la temperatura a 90°C (n= 5-7), se observa un aumento del rendimiento (40-50%), sin embargo, al aumentar el porcentaje de AIBN, empeoran las propiedades texturales de los polímeros. Únicamente se obtuvieron buenos resultados con un 1% de AIBN (n=5), por este motivo no se llevó a cabo la polimerización empleando un 15% de AIBN.

A continuación se variaron las proporciones de la mezcla de reacción. Con la proporción 60% monómero-40% crosslinker, a 70°C (n= 8-10) se volvió a observar el mismo fenómeno que con la proporción anterior, es decir, que al aumentar el porcentaje de AIBN, mejoraban las propiedades texturales de los polímeros (aunque los rendimientos fueron menores al 30%), por lo que se descartó emplear un 1% de AIBN. Al pasar a la proporción 70% monómero-30% mezcla de crosslinker (n= 12-14), a 70°C se obtuvieron resultados satisfactorios empleando 5%

y 10% de AIBN (n= 12 y 13), sin embargo, a 90°C, el tamaño de poro disminuyó considerablemente.

Como resumen, podemos decir que la temperatura de reacción que mejores resultado proporcionó fue 70°C, concretamente, las entradas n= 4, 9, 10, 12 y 13 de la Tabla 14.

Con el objetivo de analizar si el uso de un surfactante mejora las propiedades de los polímeros, se lleva a cabo la polimerización con Tween 80 (30%), manteniendo constantes el resto de variables de las entradas n= 4, 9, 10, 12 y 13. Aunque los resultados obtenidos son satisfactorios (n= 16-20, Tabla 21), no se mejoran las propiedades texturales de la entrada n= 4.

Por tanto, el polímero seleccionado para llevar a cabo el proceso de inmovilización-estabilización de enzimas es el poli(AGE-co-DAPE-DVB)-4, pero primero, realizamos un estudio de reproducibilidad del método de polimerización y una caracterización de dicho polímero.

- **Estudio de reproducibilidad del método de polimerización.**

El estudio de reproducibilidad se llevó a cabo realizando 5 polimerizaciones en días diferentes, bajo las mismas condiciones, obteniéndose una elevada reproducibilidad del método de polimerización. En la Tabla 22 se muestran los resultados obtenidos en este estudio.

**Tabla 22.** Resultados obtenidos en el estudio de reproducibilidad de la técnica de polimerización.

Polimerización	Rto. (%)	Volumen de poro (cm <sup>3</sup> /g)	Tamaño de poro (nm)	Superficie BET (m <sup>2</sup> /g)
1 <sup>a</sup>	33,7	1,60	19,9	333,1
2 <sup>a</sup>	32,8	1,64	17,8	350,0
3 <sup>a</sup>	33,9	1,59	19,3	335,6
4 <sup>a</sup>	33,5	1,48	20,5	330,7
5 <sup>a</sup>	34,3	1,61	19,7	334,9
Desviación estándar	0,5	0,05	0,9	6,8

Rto.: Rendimiento de la polimerización.

%: Representa el porcentaje en peso.

### 5.3.2.1.B. Caracterización de poli(AGE-co-DAPE-DVB)-4.

#### 1. Análisis y caracterización de los grupos epóxido.

##### a) Determinación del grado de epoxidación del polímero.

**Tabla 23.** Grado de epoxidación de poli(AGE-co-DAPE-DVB)-4.

Polímero	Grado de epoxidación (mmol epóxido/g de polímero)		
	Teórico <sup>a</sup>	Análisis elemental	Valoración <sup>b</sup>
Poli(AGE-co-DAPE-DVB)-4	---- <sup>c</sup>	---- <sup>d</sup>	0.86

<sup>a</sup> Calculado teniendo en cuenta la mezcla de reacción y el rendimiento de la polimerización.

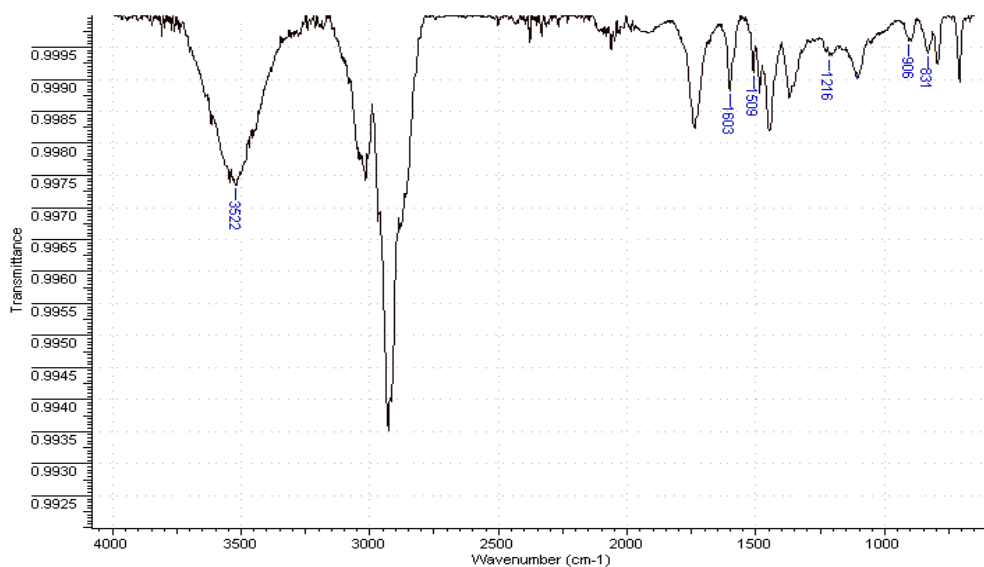
<sup>b</sup> Tritiación con bromuro de tetraetil amonio y ácido perclórico en presencia de cristal violeta.

<sup>c</sup> En estos casos no se cálculo el grado de epoxidación teórico debido a los bajos rendimientos de las polimerizaciones.

<sup>d</sup> En estos casos no se realizó el cálculo del grado de epoxidación por análisis elemental debido a que tanto los monómeros como los crosslinker poseían heteroátomos.

## b) Caracterización de los grupos epóxido mediante espectroscopia de infrarrojo (ATR/FT-IR).

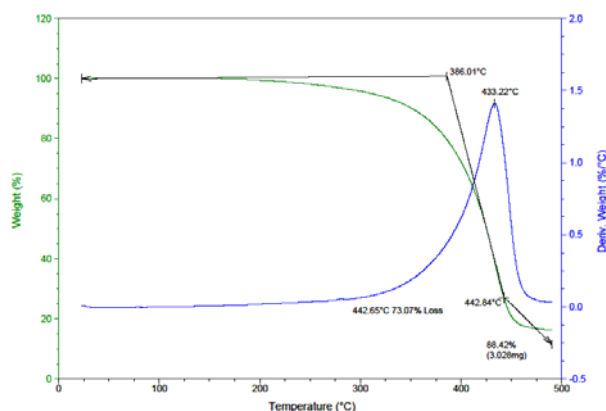
En la Figura 28 se muestra el espectro obtenido mediante ATR del polímero caracterizado. En el espectro se pueden observar las señales características de polímeros funcionalizados con grupos epóxidos y grupos hidroxilo: una banda de stretching  $\text{-OH}$  a  $3522\text{ cm}^{-1}$ , una banda a  $906\text{ cm}^{-1}$  característica de la absorción por grupos epóxido, una banda a  $1216\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la vibración del grupo epóxido ( banda de vibración C-O-C de un éter cíclico) y bandas a  $1603$ ,  $1509$  y  $831\text{ cm}^{-1}$  características de anillos aromáticos sustituidos en polímeros funcionalizados con grupos epóxido.



**Figura 28.** Espectro ATR del polímero poli(AGE-co-DAPE-DVB)-4.

## 2. Comportamiento térmico: Análisis termogravimétrico (TGA).

En la Figura 29, se puede observar el análisis termogravimétrico del polímero caracterizado. Dicho análisis muestra que este polímero presenta una excelente estabilidad térmica hasta los  $190^{\circ}\text{C}$ , más allá de esta temperatura el material comienza a descomponerse y su pérdida de peso se hace evidente.



**Figura 29.** Análisis termogravimétrico del polímero poli(AGE-co-DAPE-DVB)-4.

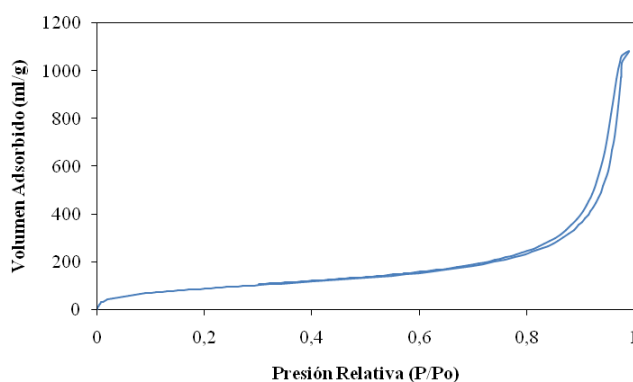
### 3. Caracterización textural.

Con las técnicas de adsorción-desorción de nitrógeno (empleando el método BJH<sup>507, 508</sup>) y microscopía electrónica de barrido se determinaron las propiedades texturales de los polímeros sintetizados.

#### a) Isotherma de adsorción-desorción de nitrógeno.

La isoterma de adsorción-desorción de nitrógeno de este polímero es de tipo IV según la clasificación BET,<sup>506</sup> anteriormente mencionada, en la que se observa un ciclo de histéresis perteneciente al tipo H1, que se ha descrito en morfologías que tienen distribuciones de poro muy angostas o aglomerados de partículas esféricas de tamaños y distribuciones aproximadamente uniformes (Figura 30).

Las ramas de adsorción y desorción de la isoterma son paralelas y llegan a unirse aproximadamente en el punto donde comienza la zona intermedia lineal ( $P/P_0$ : 0.74  $\rightarrow$  Radio de poro mesoporoso: 32.6 nm), presentando un pequeño ciclo de histéresis. Estos fenómenos de histéresis que aparecen en la zona de desorción de la multicapa están asociados a la condensación capilar en estructuras mesoporosas.



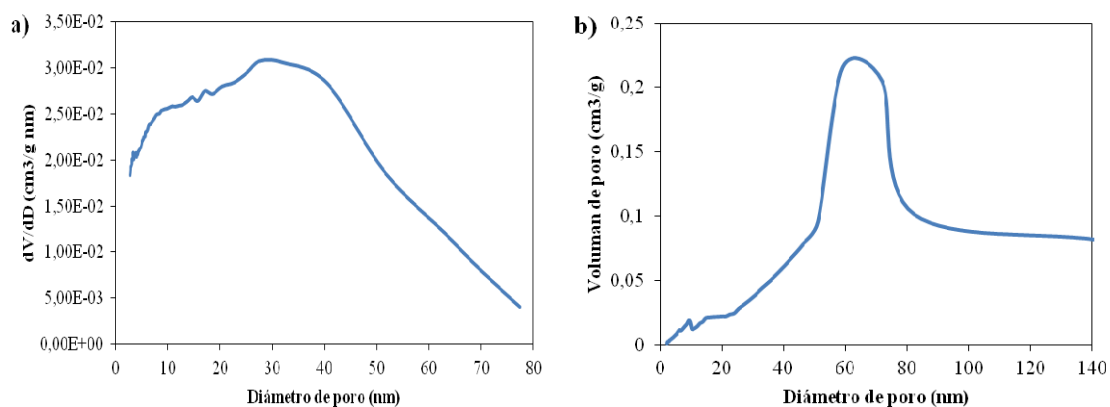
**Figura 30.** Isotherma de adsorción de nitrógeno del polímero poli(AGE-co-DAPE-DVB)-4.

#### b) Distribución de poro.

En la Figura 31 se presenta la distribución de poro y en la Tabla 24 se representa la distribución del volumen de poro de este polímero. Como se puede observar, aunque los macroporos contribuyen de forma importante al volumen de poro, el polímero es mayoritariamente mesoporoso.

**Tabla 24.** Distribución del volumen de poro agrupando los poros por grupos de tamaño.

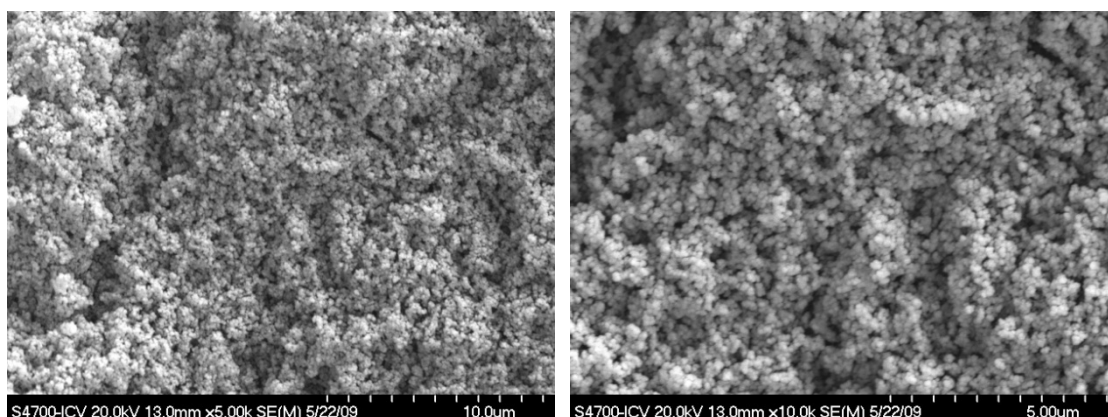
Diámetro (nm)	< 5	5-10	10-15	15-20	20-30	30-50	50-100	>100
Distribución del volumen de poro (%vol.)	4,59	6,60	6,88	5,33	11,85	21,03	38,61	5,10



**Figura 31.** Distribución de tamaño de poro determinado a partir de los datos de adsorción empleando el método BJH.<sup>507, 508</sup> a) Distribución del tamaño de poro. b) Distribución del volumen de poro.

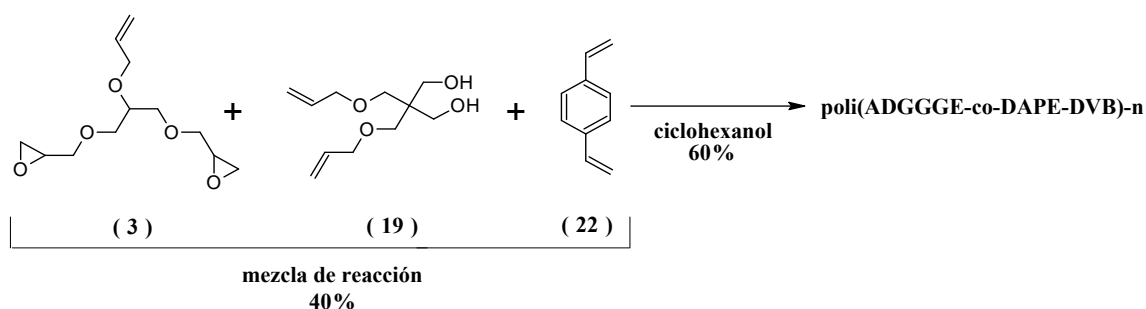
### c) Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

En la Figura 32 se muestran las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido del polímero poli(AGE-co-DAPE-DVB)-4. La morfología encontrada es típica de agregados de partículas, con poros interconectados formados en el espacio interparticular.



**Figura 32.** Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido.

#### 5.3.2.2.A. Síntesis y porosimetría de polímeros de 2-alil-1,3-diglicidilglicerol éter (ADGGE) (3) con mezcla de crosslinker dialil pentaeritritol éter (DAPE) (19) y DVB (22): poli (ADGGE-co-DAPE-DVB)-n.



**Esquema 46.** Síntesis de poli(ADGGE-co-DAPE-DVB)-n.

Apoyados en los resultados obtenidos en las polimerizaciones del monómero ADGGE con DVB y del monómero AGE con la mezcla de crosslinker, decidimos llevar a cabo las polimerizaciones con AIBN, a unas temperaturas de 70°C y 90°C, y si emplear surfactante (Esquema 46). Los resultados obtenidos en estas polimerizaciones aparecen reflejados en la Tabla 25.

Analizando en detalle los resultados obtenidos en estas polimerizaciones, se observa que a 70°C, los mejores resultados se obtienen con un 5% de AIBN (n= 21), y al aumentar el porcentaje de AIBN al 10%, disminuye el tamaño de poro, por lo que no se probó con el 15% de AIBN.

Igualmente se observa que a 90°C, los mejores resultados se obtienen con un 5% de AIBN, disminuyendo el tamaño de poro al aumentar al 10% de AIBN.

**Tabla 25.** Síntesis y propiedades texturales de poli(ADGGE-co-DAPE-DVB)-n (n=1-12).

Entrada (n)	Mezcla de reacción			Iniciador (%)	T <sup>a</sup> (°C)	Rto. (%)	Volumen de poro (cm <sup>3</sup> /g)	Tamaño de poro (nm)	Superficie BET (m <sup>2</sup> /g)	R
	% ADGGE	% crosslinker (19)	% crosslinker (DVB)							
1	50	25	25	1% AIBN	70	31,2	0,92	13,9	280,0	0,05
2	50	25	25	5% AIBN	70	33,8	0,84	18,0	196,3	0,09
3	50	25	25	10% AIBN	70	33,1	0,97	17,2	237,5	0,07
4	50	25	25	1% AIBN	90	30,4	1,10	13,1	358,4	0,04
5	50	25	25	5% AIBN	90	32,2	1,40	18,3	319,0	0,06
6	50	25	25	10% AIBN	90	31,9	1,19	15,5	323,2	0,05
7	25	50	25	1% AIBN	70	31,0	0,70	13,7	217,2	0,06
8	25	50	25	5% AIBN	70	29,0	0,97	13,1	321,2	0,04
9	25	50	25	10% AIBN	70	31,2	0,89	15,9	236,2	0,07
10	25	50	25	1% AIBN	90	38,2	0,86	18,6	191,0	0,10
11	25	50	25	5% AIBN	90	34,7	0,90	12,1	301,3	0,04
12	25	50	25	10% AIBN	90	37,4	0,67	6,1	276,8	0,02

%: Expresa el porcentaje en peso.

Rto.: Rendimiento de la polimerización.

R: Relación tamaño de poro/superficie específica.

Como el monómero **3** tiene dos grupos epóxido en vez de uno en el caso anterior (AGE), se decidió probar también otra mezcla de reacción, empleando un 25% de monómero y un 75% de mezcla de crosslinker (50% crosslinker **19** y 25% DVB (**22**), con el fin de aumentar la hidrofiliidad del polímero, sin que disminuya el grado de epoxidación. Estas polimerizaciones, se realizaron a 70°C y 90°C, empleando diferentes porcentajes de iniciador radicalario AIBN (n= 12-17).

Una vez comparados todos los resultados, se decidió seleccionar el polímero que presentó mayor tamaño de poro y una superficie específica superior a 100 m<sup>2</sup> / g, es decir, la entrada n= 10. Por tanto, se realizó un estudio de reproducibilidad del método de polimerización y la caracterización de dicho polímero.

- **Estudio de reproducibilidad del método de polimerización.**

El estudio de reproducibilidad se llevó a cabo realizando 5 polimerizaciones en días diferentes, bajo las mismas condiciones, obteniéndose una elevada reproducibilidad del método de polimerización. En la Tabla 26 se muestran los resultados obtenidos en este estudio.

**Tabla 26.** Resultados obtenidos en el estudio de reproducibilidad de la técnica de polimerización.

Polimerización	Rto. (%)	Volumen de poro (cm <sup>3</sup> /g)	Tamaño de poro (nm)	Superficie BET (m <sup>2</sup> /g)
1 <sup>a</sup>	38,2	0,86	18,6	191,0
2 <sup>a</sup>	41,3	0,89	17,7	200,7
3 <sup>a</sup>	40,6	0,85	19,4	188,9
4 <sup>a</sup>	36,9	0,78	18,2	193,5
5 <sup>a</sup>	37,5	0,80	18,9	190,4
Desviación estándar	1,7	0,04	0,6	4,2

Rto.: Rendimiento de la polimerización.

### 5.3.2.2.B. Caracterización de poli(ADGGE-co-DAPE-DVB)-10.

#### 1. Análisis y caracterización de los grupos epóxido.

##### a) Determinación del grado de epoxidación del polímero.

**Tabla 27.** Grado de epoxidación de poli(ADGGE-co-DAPE-DVB)-10.

Polímero	Grado de epoxidación (mmol epóxido/g de polímero)		
	Teórico <sup>a</sup>	Análisis elemental	Valoración <sup>b</sup>
Poli(ADGGE-co-DAPE-DVB)-10	---- <sup>c</sup>	---- <sup>d</sup>	0.53

<sup>a</sup> Calculado teniendo en cuenta la mezcla de reacción y el rendimiento de la polimerización.

<sup>b</sup> Tritiación con bromuro de tetraetil amonio y ácido perclórico en presencia de cristal violeta.

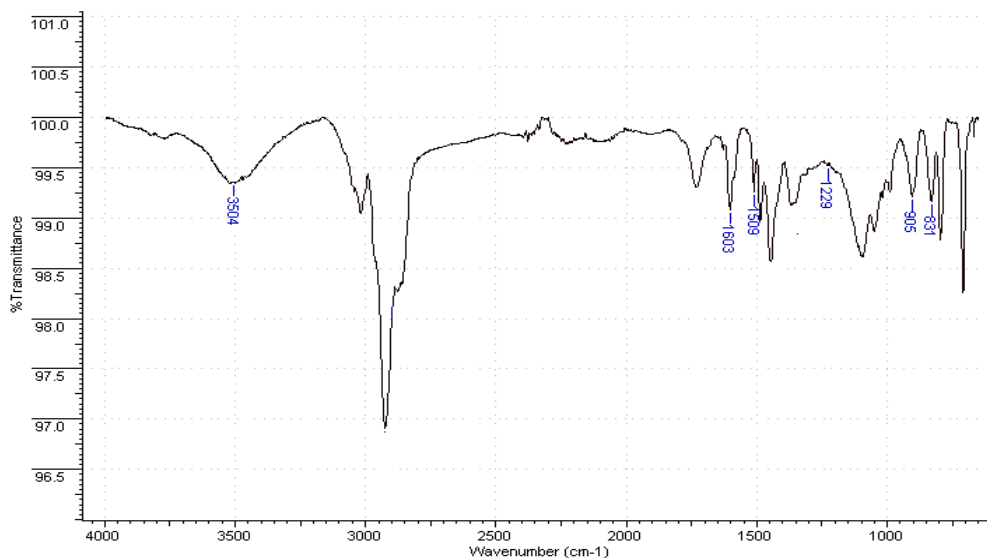
<sup>c</sup> En estos casos no se cálculo el grado de epoxidación teórico debido a los bajos rendimientos de las polimerizaciones.

<sup>d</sup> En estos casos no se realizo el cálculo del grado de epoxidación por análisis elemental debido a que tanto los monómeros como los crosslinker poseían hetero átomos.

##### b) Caracterización de los grupos epóxido mediante espectroscopia de infrarrojo (ATR/FT-IR).

En la Figura 33 se muestra el espectro obtenido mediante ATR del polímero caracterizado. En el espectro se pueden observar las señales características de polímeros funcionalizados con grupos epóxido y grupos hidroxilo: una banda de stretching –OH a 3504 cm<sup>-1</sup>, una banda a 905cm<sup>-1</sup> característica de la absorción por grupos epóxido, una banda a 1229 cm<sup>-1</sup> correspondiente a la vibración del grupo epóxido ( banda de vibración C-O-C de un

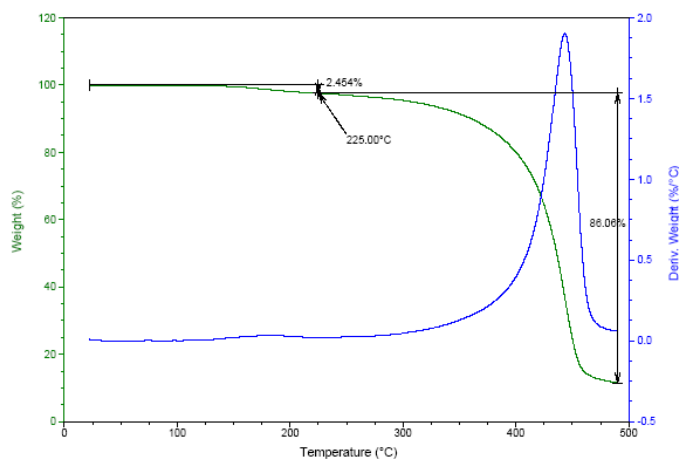
éter cíclico) y bandas a 1603, 1509 y 831  $\text{cm}^{-1}$  características de anillos aromáticos sustituidos en polímeros funcionalizados con grupos epóxido.



**Figura 33.** Espectro ATR del polímero poli(ADGGE-co-DAPE-DVB)-10.

## 2. Comportamiento térmico: Análisis termogravimétrico (TGA).

En la Figura 34, se puede observar el análisis termogravimétrico del polímero caracterizado. Dicho análisis muestra que este polímero presenta una excelente estabilidad térmica hasta los 160° C, más allá de esta temperatura el material comienza a descomponerse y su pérdida de peso se hace evidente.



**Figura 34.** Análisis termogravimétrico del polímero poli(ADGGE-co-DAPE-DVB)-10.

## 3. Caracterización textural.

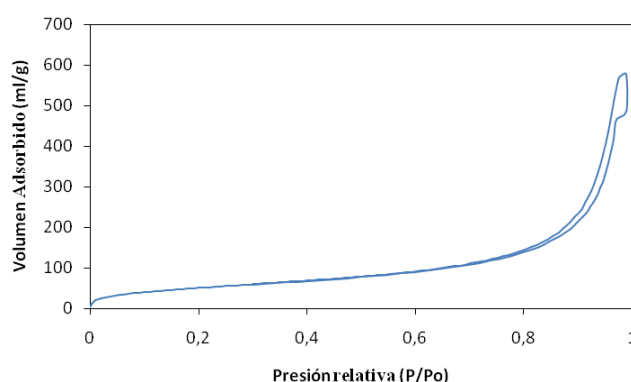
Con las técnicas de adsorción-desorción de nitrógeno (empleando el método BJH <sup>507, 508</sup>) y microscopía electrónica de barrido se determinaron las propiedades texturales de los polímeros sintetizados.



### a) Isotherma de adsorción-desorción de nitrógeno.

La isoterma de adsorción-desorción de nitrógeno de este polímero es de tipo IV según la clasificación BET,<sup>506</sup> anteriormente mencionada, en la que se observa un ciclo de histéresis perteneciente al tipo H1, que se ha descrito en morfologías que tienen distribuciones de poro muy angostas o aglomerados de partículas esféricas de tamaños y distribuciones aproximadamente uniformes (Figura 35).

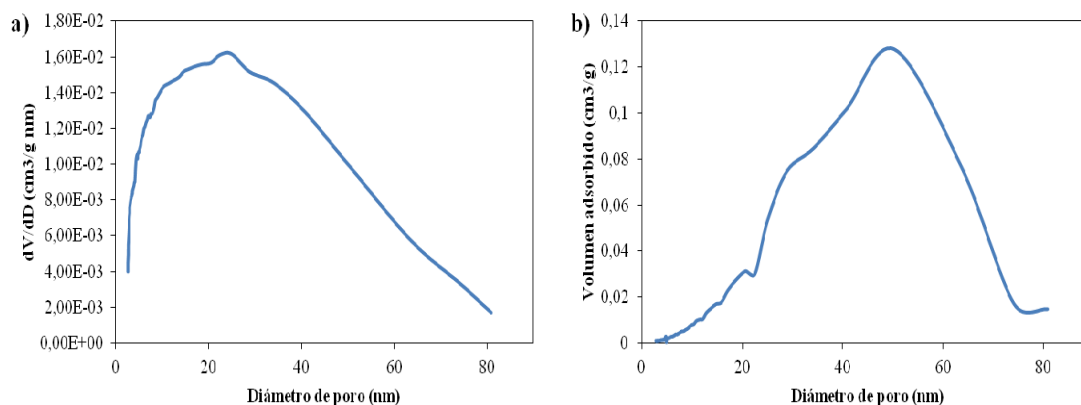
Las ramas de adsorción y desorción de la isoterma son paralelas y llegan a unirse aproximadamente en el punto donde comienza la zona intermedia lineal (P/Po: 0.77 → Radio de poro mesoporoso: 37.4 nm), presentando un pequeño ciclo de histéresis. Estos fenómenos de histéresis que aparecen en la zona de desorción de la multicapa están asociados a la condensación capilar en estructuras mesoporosas.



**Figura 35.** Isotherma de adsorción de nitrógeno del polímero poli(ADGGE-co-DAPE-DVB)-10.

### b) Distribución de poro.

En la Figura 36 se presenta la distribución de poro y en la Tabla 28 se representa la distribución del volumen de poro de este polímero. Como se puede observar, este polímero es fundamentalmente mesoporoso y la presencia de mesoporos de gran tamaño contribuye mayoritariamente al volumen de poro del polímero.



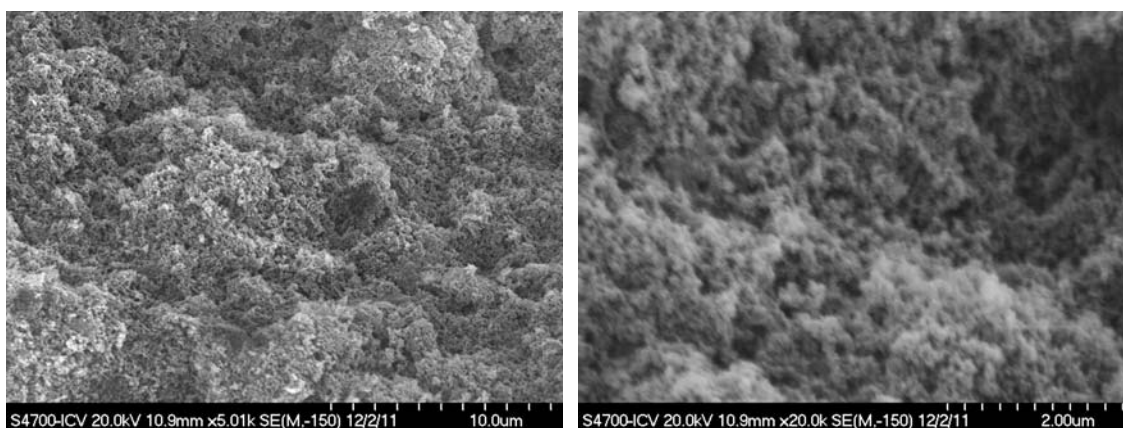
**Figura 36.** Distribución de tamaño de poro determinado a partir de los datos de adsorción empleando el método BJH.<sup>507, 508</sup> a) Distribución del tamaño de poro. b) Distribución del volumen de poro.

**Tabla 28.** Distribución del volumen de poro agrupando los poros por grupos de tamaño.

Diámetro (nm)	< 5	5-10	10-15	15-20	20-30	30-50	50-100	>100
Distribución del volumen de poro (%vol.)	5,53	7,78	7,86	7,74	10,81	21,00	24,59	14,69

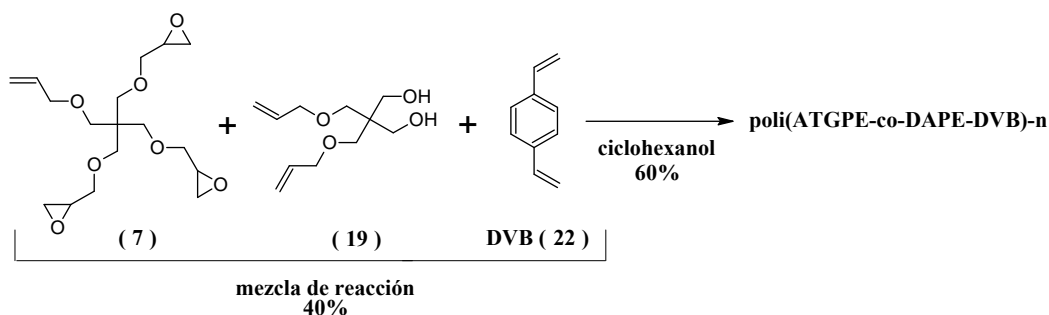
### c) Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

En la Figura 37 se muestran las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido del polímero poli(ADGGE-*co*-DAPE-DVB)-10. La morfología encontrada es típica de agregados de partículas, con poros interconectados formados en el espacio interparticular.

**Figura 37.** Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido.

#### 5.3.2.3.A. Síntesis, superficie específica y porosidad de los polímeros de alil triglicidil pentaeritritol éter (ATGPE) (7) con mezcla de crosslinker dialil pentaeritritol éter (DAPE) (19) y DVB (22): poli(ATGPE-*co*-DAPE-DVB)-n.

Finalmente, se llevan a cabo las polimerizaciones con el monómero ATGPE (7) con la mezcla de crosslinker, bajo las mismas condiciones empleadas en los polímeros anteriores (Esquema 47). Los resultados obtenidos en estas polimerizaciones aparecen reflejados en la Tabla 29.

**Esquema 47.** Síntesis de poli(ATGPE-*co*-DAPE-DVB)-n.

Analizando los datos de la Tabla 29, vemos que se han obtenido resultados muy similares a los obtenidos para el monómero que presenta dos grupos epóxido (ADGGE). Los mejores

resultados se obtuvieron en la entrada n= 6, es decir, empleando una mezcla de reacción compuesta por un 50% de monómero, un 50 % de crosslinker (25% DAPE y 25% DVB), con un 10% de AIBN a 90°C. Por lo tanto este es el polímero seleccionado para llevar a cabo la inmovilización-estabilización de enzimas. A continuación se realizó un estudio de la reproducibilidad del método de polimerización y la caracterización del polímero poli(ATGPE-co-DAPE-DVB)-6.

**Tabla 29.** Síntesis y propiedades texturales de poli(ATGPE-co-DAPE-DVB)-n (n= 1-12).

Entrada (n)	Mezcla de reacción			Iniciador (%)	T <sup>a</sup> (°C)	Rto. (%)	Volumen de poro (cm <sup>3</sup> /g)	Tamaño de poro (nm)	Superficie BET (m <sup>2</sup> /g)	R
	% ATGPE	% crosslinker (19)	% crosslinker (DVB)							
1	50	25	25	1% AIBN	70	33,4	0,66	15,6	178,6	0,09
2	50	25	25	5% AIBN	70	36,5	0,64	16,2	166,5	0,10
3	50	25	25	10% AIBN	70	37,3	0,61	17,5	145,8	0,12
4	50	25	25	1% AIBN	90	33,6	0,78	14,8	222,9	0,07
5	50	25	25	5% AIBN	90	34,7	0,83	19,4	179,5	0,11
6	50	25	25	10% AIBN	90	36,8	1,47	21,8	280,4	0,08
7	25	50	25	1% AIBN	70	28,6	0,82	10,9	329,4	0,03
8	25	50	25	5% AIBN	70	33,0	0,74	15,9	197,0	0,08
9	25	50	25	10% AIBN	70	32,3	0,70	17,9	163,8	0,11
10	25	50	25	1% AIBN	90	31,9	0,92	11,6	341,9	0,03
11	25	50	25	5% AIBN	90	34,9	0,88	14,7	252,3	0,06
12	25	50	25	10% AIBN	90	35,6	1,12	18,6	252,2	0,07

%: Expresa el porcentaje en peso.

Rto.: Rendimiento de la polimerización.

R: Relación tamaño de poro/superficie específica.

- **Estudio de reproducibilidad del método de polimerización.**

El estudio de reproducibilidad se llevó a cabo realizando 5 polimerizaciones en días diferentes, bajo las mismas condiciones, obteniéndose una elevada reproducibilidad del método de polimerización. En la Tabla 30 se muestran los resultados obtenidos en este estudio.

**Tabla 30.** Resultados obtenidos en el estudio de reproducibilidad de la técnica de polimerización.

Polimerización	Rto. (%)	Volumen de poro (cm <sup>3</sup> /g)	Tamaño de poro (nm)	Superficie BET (m <sup>2</sup> /g)
1 <sup>a</sup>	36,8	1,47	21,8	280,4
2 <sup>a</sup>	35,6	1,43	22,3	270,8
3 <sup>a</sup>	38,1	1,56	20,5	285,7
4 <sup>a</sup>	37,0	1,55	19,6	297,3
5 <sup>a</sup>	37,5	1,43	23,1	259,8
Desviación estándar	0,8	0,06	1,3	12,8

Rto.: Rendimiento de la polimerización.

%: Representa el porcentaje en peso.

### 5.3.2.3.B. Caracterización de poli(ATGPE-co-DAPE-DVB)-6.

#### 1. Análisis y caracterización de los grupos epóxido.

##### a) Determinación del grado de epoxidación del polímero.

En la Tabla 31 se observan los resultados obtenidos en la valoración de los grupos epóxido de este polímero.

**Tabla 31.** Grado de epoxidación de poli(ATGPE-co-DAPE-DVB)-6.

Polímero	Grado de epoxidación (mmol epóxido/g de polímero)		
	Teórico <sup>a</sup>	Análisis elemental	Valoración <sup>b</sup>
Poli(ATGPE-co-DAPE-DVB)-6	---- <sup>c</sup>	---- <sup>d</sup>	0.90

<sup>a</sup> Calculado teniendo en cuenta la mezcla de reacción y el rendimiento de la polimerización.

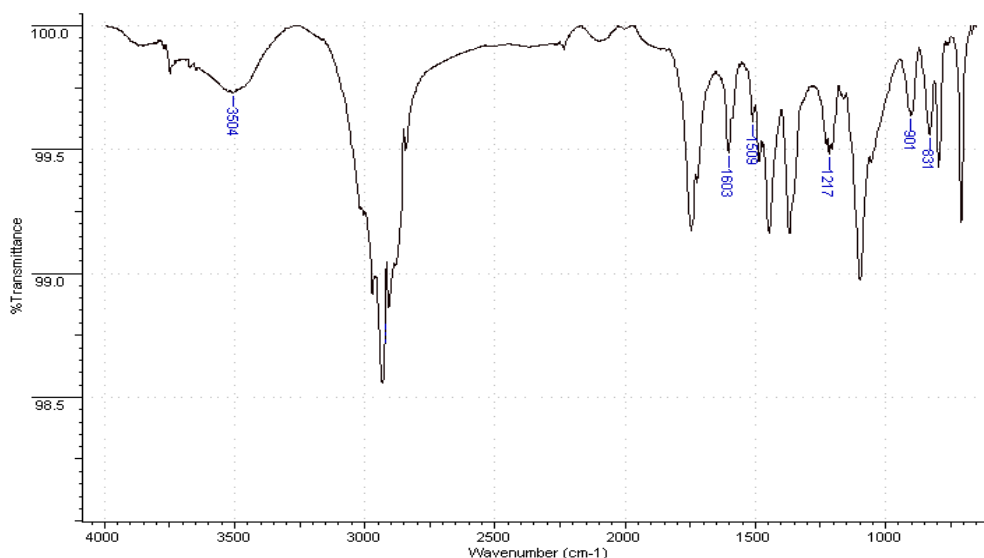
<sup>b</sup> Tritiación con bromuro de tetraetil amonio y ácido perclórico en presencia de cristal violeta.

<sup>c</sup> En estos casos no se cálculo el grado de epoxidación teórico debido a los bajos rendimientos de las polimerizaciones.

<sup>d</sup> En estos casos no se realizo el cálculo del grado de epoxidación por análisis elemental debido a que tanto los monómeros como los crosslinker poseían hetero átomos.

##### b) Caracterización de los grupos epóxido mediante espectroscopia de infrarrojo (ATR/FT-IR).

En la Figura 38 se muestra el espectro obtenido mediante ATR del polímero caracterizado. En el espectro se pueden observar las señales características de polímeros funcionalizados con grupos epóxido y grupos hidroxilo: una banda correspondiente al sretching -OH a  $3504\text{ cm}^{-1}$ , una banda a  $901\text{ cm}^{-1}$  característica de la absorción por grupos epóxido, una banda a  $1217\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la vibración del grupo epóxido ( banda de vibración C-O de un éter cíclico) y bandas a  $1603$ ,  $1509$  y  $831\text{ cm}^{-1}$  características de anillos aromáticos sustituidos en polímeros funcionalizados con grupos epóxido.



**Figura 38.** Espectro ATR del polímero poli(ATGPE-co-DAPE-DVB)-6.

## 2. Comportamiento térmico: Análisis termogravimétrico (TGA).

En la Figura 39, se puede observar el análisis termogravimétrico del polímero caracterizado. Dicho análisis muestra que este polímero presenta una excelente estabilidad térmica hasta los 200° C, más allá de esta temperatura el material comienza a descomponerse y su pérdida de peso se hace evidente.

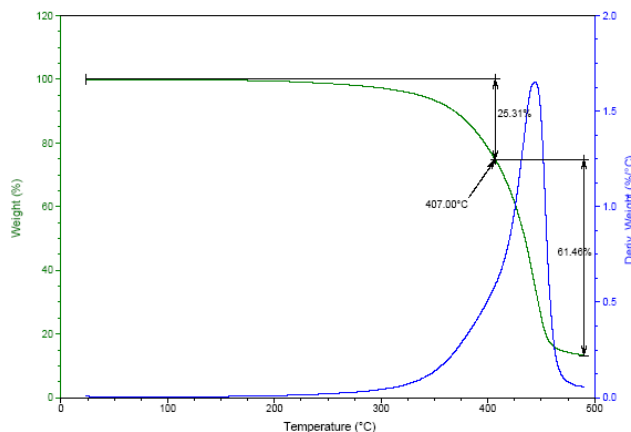


Figura 39. Análisis termogravimétrico del polímero poli(ATGPE-co-DAPE-DVB)-6.

## 3. Caracterización textural.

Con las técnicas de adsorción-desorción de nitrógeno (empleando el método BJH <sup>507, 508</sup>) y microscopía electrónica de barrido se determinaron las propiedades texturales de los polímeros sintetizados.

### a) Isotherma de adsorción-desorción de nitrógeno.

La isoterma de adsorción-desorción de nitrógeno de este polímero es de tipo IV según la clasificación BET, <sup>506</sup> anteriormente mencionada, en la que se observa un ciclo de histéresis perteneciente al tipo H1, que se ha descrito en morfologías que tienen distribuciones de poro muy angostas o aglomerados de partículas esféricas de tamaños y distribuciones aproximadamente uniformes (Figura 40).

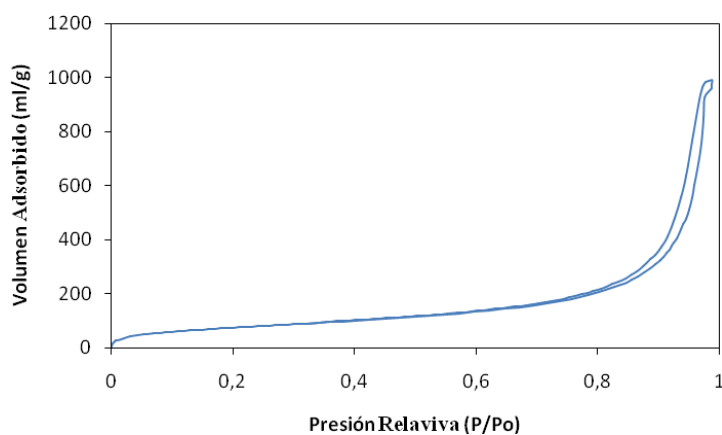
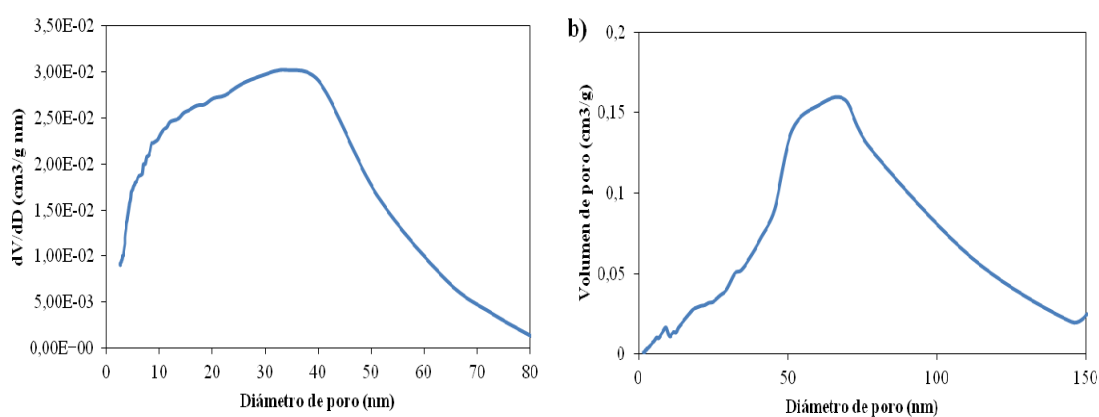


Figura 40. Isotherma de adsorción de nitrógeno del polímero poli(ATGPE-co-DAPE-DVB)-6.

Las ramas de adsorción y desorción de la isoterma son paralelas y llegan a unirse aproximadamente en el punto donde comienza la zona intermedia lineal ( $P/P_0$ : 0.76  $\rightarrow$  Radio de poro mesoporoso: 35.7 nm), presentando un pequeño ciclo de histéresis. Estos fenómenos de histéresis que aparecen en la zona de desorción de la multicapa están asociados a la condensación capilar en estructuras mesoporosas.

### b) Distribución de poro.

En la Figura 41 se presenta la distribución de poro y en la Tabla 32 se representa la distribución del volumen de poro de este polímero. Como se puede observar el polímero es fundamentalmente mesoporoso y los mesoporos de gran tamaño contribuyen significativamente al volumen de poro del polímero.



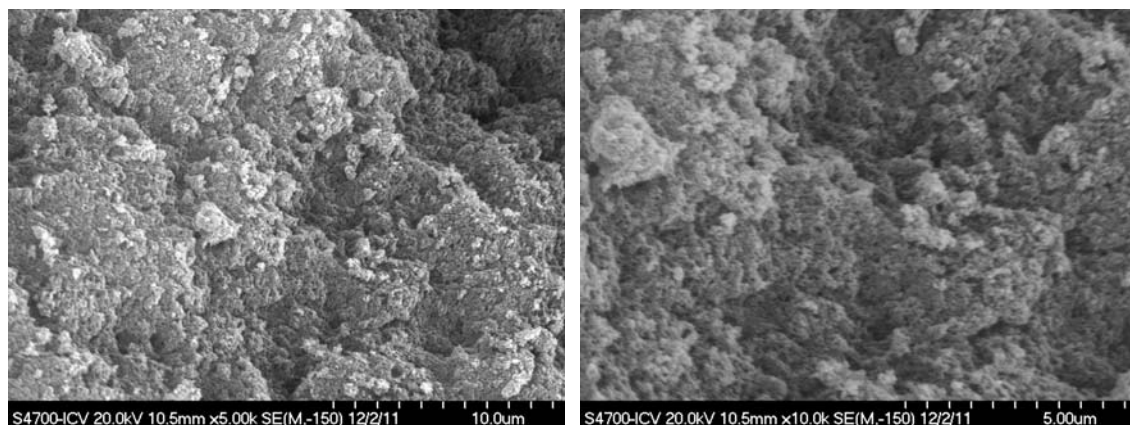
**Figura 41.** Distribución de tamaño de poro determinado a partir de los datos de adsorción empleando el método BJH.<sup>507, 508</sup> a) Distribución del tamaño de poro. b) Distribución del volumen de poro.

**Tabla 32.** Distribución del volumen de poro agrupando los poros por grupos de tamaño.

Diámetro (nm)	< 5	5-10	10-15	15-20	20-30	30-50	50-100	>100
Distribución del volumen de poro (%vol.)	4,42	6,21	6,65	6,62	13,12	18,70	38,56	5,71

### c) Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

En la Figura 42 se muestran las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido del polímero poli (ATGPE-co-DAPE-DVB)-6. La morfología encontrada es típica de agregados de partículas, con poros interconectados formados en el espacio interparticular.



**Figura 42.** Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido.

#### **5.3.2.4. Resumen comparativo de las polimerizaciones de alquioxiranos con la mezcla de agentes de entrecruzamiento alquílico y arílico.**

Como resumen de las polimerizaciones de alquioxiranos con la mezcla de agentes de entrecruzamiento alquílico y arílico podemos decir que:

- a) El monómero que origina los polímeros con mejores propiedades texturales es el alil triglicidil pentaeritritol éter (7), a continuación el alil glicidil éter (AGE) y, por último, el 2-alil-1,3-diglicidilglicerol éter (3).
- b) Los porcentajes relativos de monómero y agente de entrecruzamiento que dan lugar a los mejores resultados varían con el empleo de los distintos monómeros.
- c) El mejor iniciador radicalario ha sido el AIBN, empleando un porcentaje que oscila entre el 5-15% respecto a la mezcla de reacción.
- d) La temperatura de polimerización ideal aumenta al incrementarse la funcionalización de los monómeros empleados.
- e) El rendimiento obtenido en las polimerizaciones mejora al aumentar la funcionalización de los monómeros empleados.
- f) Aunque en estas reacciones de polimerización haya disminuido el rendimiento, se ha aumentado la hidrofiliidad de los polímeros sintetizados.

El gran inconveniente que se han tenido en estas polimerizaciones ha sido los bajos rendimientos obtenidos debido a la baja reactividad de los monómeros y del agente de entrecruzamiento alquílico frente a la polimerización radicalaria. Esta deficiencia se subsanó con el siguiente grupo de monómeros, tipo metacrilatos, que presentan una mayor reactividad en las reacciones de polimerización radicalaria.

#### **5.3.3. Síntesis, superficie específica y porosidad de polímeros con metacriloalquioxiranos.**

Se empieza con la preparación de los polímeros más sencillos, es decir, aquellos que están compuestos por un monómero metacrílico y un agente de entrecruzamiento metacrílico.

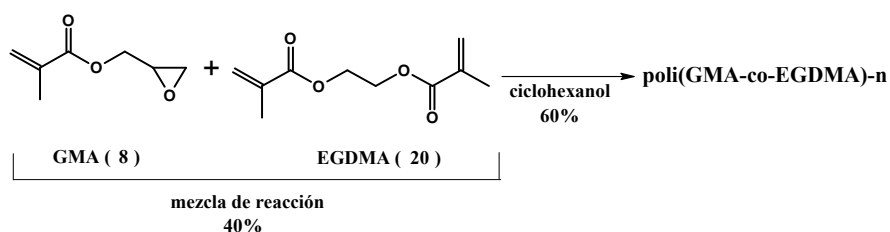
### 5.3.3.1. Síntesis, superficie específica y porosidad de polímeros con metacriloxiranos con agente de entrecruzamiento metacrílico.

Los metacrilatos, en general, son muy reactivos frente a la polimerización via radicales libres, por eso es que las reacciones de polimerización de los monómeros tipo metacriloxirano, transcurren con buenos rendimientos.

Siguiendo con la misma filosofía empleada en las polimerizaciones de los monómeros alquiloirano, se comienza con las polimerizaciones del monómero metacriloxirano funcionalizado con un grupo epóxido, seguidas del que presenta dos grupos epóxido y finalmente las del que presenta tres grupos epóxido. Como agentes de entrecruzamiento se emplearon el etilenglicol dimetacrilato (EGDMA) (20) y el hexanodiol dimetacrilato (HDDMA) (21).

#### 5.3.3.1.1.A. Síntesis, superficie específica y porosidad de polímeros con glicidil metacrilato (GMA) (8) con EGDMA (20): poli(GMA-co-EGDMA)-n.

El monómero funcionalizado con un grupo epóxido que se utiliza en este estudio es el compuesto comercial, glicidil metacrilato (GMA) (8) (Esquema 48). Son varios los artículos publicado en los que se hace referencia a la síntesis de poli(GMA-co-EGDMA) empleando diferentes técnicas,<sup>375, 380-382, 390, 510, 515, 516</sup> en algunos de ellos, se reporta la inmovilización de enzimas como: amiloglucosidasa de *Endomycopsis bispora* y *Aspergillus niger*,<sup>375</sup>  $\alpha$ -glucosidasa de levadura de pan,<sup>382</sup> lipasa de *Arthrobacter*<sup>380, 510</sup> ó la lipasa B ce *Candida antartica*.<sup>390, 516</sup>



**Esquema 48.** Síntesis de poli(GMA-co-EGDMA)-n.

A apoyados en el amplio estudio de las polimerizaciones de monómeros metacrilatos, nos centramos en el empleo de: temperaturas de reacción de 50°C y 70°C, AIBN como iniciador radicalario (1%-10%) y, proporciones de monómero (60%-70%) y crosslinker (40%-30%) en la mezcla de reacción. Todos los resultados obtenidos quedan reflejados en la Tabla 33.

Como era de esperar, los rendimientos de estas polimerizaciones son muy elevados, sin embargo, en lo que respecta a la porosidad de los polímeros obtenidos, existen desigualdades, dependiendo del tipo de variante introducida.

Así, para la mezcla de reacción compuesta por GMA (60%) y EGDMA (40%) a 50°C, únicamente se obtienen buenos resultados empleando un 1% de AIBN (n= 11), mientras que a 70°C, se obtienen buenos resultados con todos los porcentajes de AIBN (n= 4-6). Cuando se



pasa a emplear la mezcla de reacción compuesta por 70% de GMA y 30% de EGDMA, únicamente se obtienen resultados satisfactorios a 70°C. En líneas generales, podemos decir que la temperatura más idónea para estas polimerizaciones es la de 70°C.

**Tabla 33.** Síntesis y propiedades texturales de poli(GMA-co-EGDMA)-n (n= 1-15).

Entrada (n)	Mezcla de reacción		% Iniciador	T <sup>a</sup> (°C)	Rto. (%)	Volumen de poro (cm <sup>3</sup> /g)	Tamaño de poro (nm)	Superficie BET (m <sup>2</sup> /g)	R
	% GMA	% crosslinker (EGDMA)							
1	60	40	1% AIBN	50	85,9	0,25	24,5	41,9	0,58
2	60	40	5% AIBN	50	96,1	0,07	36,1	8,2	4,40
3	60	40	10% AIBN	50	96,3	0,10	38,0	10,6	3,58
4	60	40	1% AIBN	70	97,6	0,24	20,0	51,0	0,39
5	60	40	5% AIBN	70	98,2	0,23	18,4	55,0	0,33
6	60	40	10% AIBN	70	97,7	0,30	20,1	61,8	0,33
7	70	30	1% AIBN	50	87,1	0,03	23,5	5,6	4,20
8	70	30	5% AIBN	50	96,2	0,03	31,3	4,1	7,63
9	70	30	10% AIBN	50	96,9	0,02	25,4	4,1	6,20
10	70	30	1% AIBN	70	> 99	0,16	20,7	32,7	0,63
11	70	30	5% AIBN	70	96,7	0,28	25,4	45,4	0,56
12	70	30	10% AIBN	70	96,4	0,23	25,2	38,3	0,66
13*	60	40	1% AIBN	50	95,1	0,04	21,2	8,1	2,62
14*	60	40	10% AIBN	70	93,0	0,01	14,9	3,4	4,38
15*	70	30	5% AIBN	70	97,6	0,01	11,9	3,4	3,50

‰: Representa el porcentaje en peso.

**Rto.:** Rendimiento de la polimerización.

**R:** Relación tamaño de poro/superficie específica.

\*30% surfactante (Tween 80) respecto a la mezcla de reacción

Utilizando las condiciones de reacción de las entradas n= 1, 6 y 11, que son con las que se obtienen las mejores propiedades texturales, se estudio el efecto de añadir un 30% de surfactante Tween 80 (n= 13-15), obteniendo un empeoramiento de las propiedades texturales debido al dramático descenso de los valores de superficie específica.

De estos polímeros, el que presenta mejores propiedades texturales es la entrada n= 11, por lo que es el elegido para llevar a cabo las pruebas de inmovilización de enzimas. A continuación se expone un estudio de reproducibilidad del método de polimerización y una caracterización más detallada de este polímero.

- **Estudio de reproducibilidad del método de polimerización.**

El estudio de reproducibilidad se llevó a cabo realizando 5 polimerizaciones en días diferentes, bajo las mismas condiciones, obteniéndose una elevada reproducibilidad del método de polimerización. En la Tabla 34 se muestran los resultados obtenidos en este estudio.

**Tabla 34.** Resultados obtenidos en el estudio de reproducibilidad de la técnica de polimerización.

Polimerización	Rto. (%)	Volumen de poro (mL/g)	Tamaño de poro (nm)	Superficie BET (m <sup>2</sup> /g)
1 <sup>a</sup>	96,7	0,28	25,4	45,4
2 <sup>a</sup>	95,3	0,24	26,2	39,9
3 <sup>a</sup>	98,6	0,31	22,2	47,3
4 <sup>a</sup>	99,1	0,35	23,9	44,1
5 <sup>a</sup>	96,2	0,25	24,3	41,5
<b>Desviación estándar</b>	1,4	0,04	1,4	2,7

Rto.: Rendimiento de la polimerización.

%: Representa el porcentaje en peso.

### 5.3.3.1.1.B. Caracterización de poli(GMA-co-EGDMA)-11.

#### 1. Análisis y caracterización de los grupos epóxido.

##### a) Determinación del grado de epoxidación.

Como se observa en la Tabla 35, el resultado de la valoración de los grupos epóxido concuerda con el margen teórico obtenido teniendo en cuenta la mezcla y el rendimiento de la polimerización.

**Tabla 35.** Grado de epoxidación de poli(GMA-co-EGDMA)-11.

Polímero	Grado de epoxidación (mmol epóxido/g de polímero)		
	Teórico <sup>a</sup>	Análisis elemental	Valoración <sup>b</sup>
<b>Poli(GMA-co-EGDMA)-11</b>	5.1-4.85	---- <sup>d</sup>	4.97

<sup>a</sup> Calculado teniendo en cuenta la mezcla de reacción y el rendimiento de la polimerización.

<sup>b</sup> Titración con bromuro de tetraetil amonio y ácido perclórico en presencia de cristal violeta.

<sup>d</sup> En estos casos no se realizó el cálculo del grado de epoxidación por análisis elemental debido a que tanto los monómeros como los crosslinker poseían hetero átomos.

##### b) Caracterización de los grupos epóxido mediante espectroscopia de infrarrojo (ATR/FTIR).

En la Figura 43 se muestra el espectro obtenido mediante ATR del polímero caracterizado. En el espectro se pueden observar las señales características de polímeros funcionalizados con grupos epóxido: una banda a 907 cm<sup>-1</sup> característica de la absorción por grupos epóxido y una banda a 1257 cm<sup>-1</sup> correspondiente a la vibración del grupo epóxido (banda de vibración C-O de un éter cíclico).

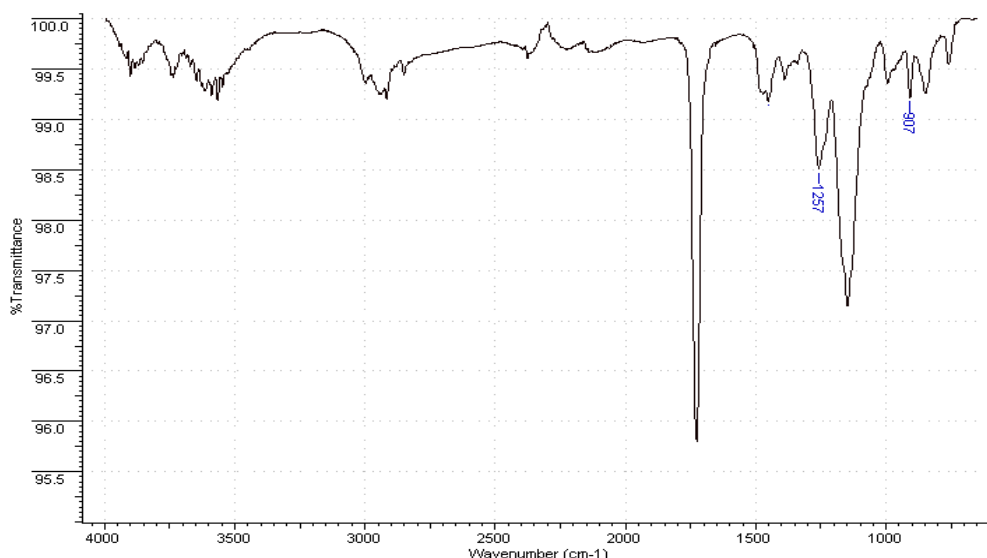


Figura 43. Espectro ATR del polímero poli (GMA-*co*-EGDMA)-11.

## 2. Comportamiento térmico: Análisis termogravimétrico (TGA).

En la Figura 44, se puede observar el análisis termogravimétrico del polímero caracterizado presenta una excelente estabilidad térmica hasta los 160° C, más allá de esta temperatura el material comienza a descomponerse y su pérdida de peso se hace evidente. Se observan tres etapas principales de pérdida de peso, la primera, a una temperatura de 240°C, corresponde a la liberación de grupos glicidiloxi, la segunda y la tercera a unas temperaturas de 300°C y 388°C, corresponden a la liberación de productos de polimerización metacrílica con menor o mayor grado de entrecruzamiento.

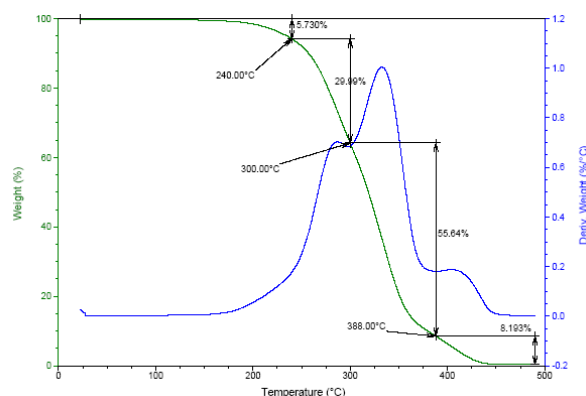


Figura 44. Análisis termogravimétrico del polímero poli (GMA-*co*-EGDMA)-11.

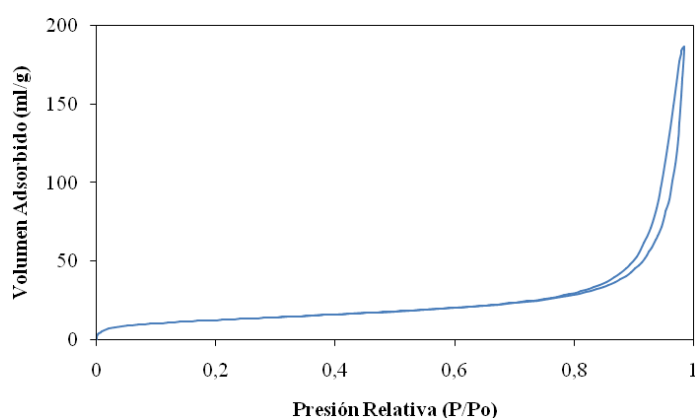
## 2. Caracterización textural.

Con las técnicas de adsorción-desorción de nitrógeno (empleando el método BJH<sup>507, 508</sup>) y microscopía electrónica de barrido se determinaron las propiedades texturales de los polímeros sintetizados.

### a) Isotherma de adsorción-desorción de nitrógeno.

La isoterma de adsorción-desorción de nitrógeno de este polímero es de tipo IV según la clasificación BET,<sup>506</sup> anteriormente mencionada, en la que se observa un ciclo de histéresis perteneciente al tipo H1, que se ha descrito en morfologías que tienen distribuciones de poro muy angostas o aglomerados de partículas esféricas de tamaños y distribuciones aproximadamente uniformes (Figura 45).

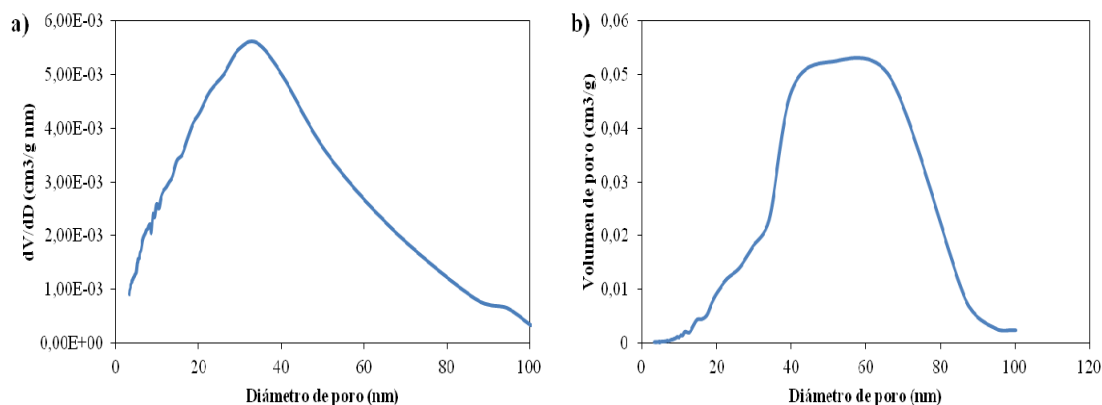
Las ramas de adsorción y desorción de la isoterma son paralelas y llegan a unirse aproximadamente en el punto donde comienza la zona intermedia lineal ( $P/P_0$ : 0.78  $\rightarrow$  Radio de poro mesoporoso: 39.3 nm), presentando un pequeño ciclo de histéresis. Estos fenómenos de histéresis que aparecen en la zona de desorción de la multicapa están asociados a la condensación capilar en estructuras mesoporosas.



**Figura 45.** Isotherma de adsorción de nitrógeno del polímero poli(GMA-co-EGDMA)-11.

### b) Distribución de poro.

En la Figura 46 se presenta la distribución de poro y en la Tabla 36 se representa la distribución del volumen de poro de este polímero. Como se puede observar este polímero es mayoritariamente mesoporoso y la presencia de mesoporos de gran tamaño contribuye significativamente al volumen de poro.



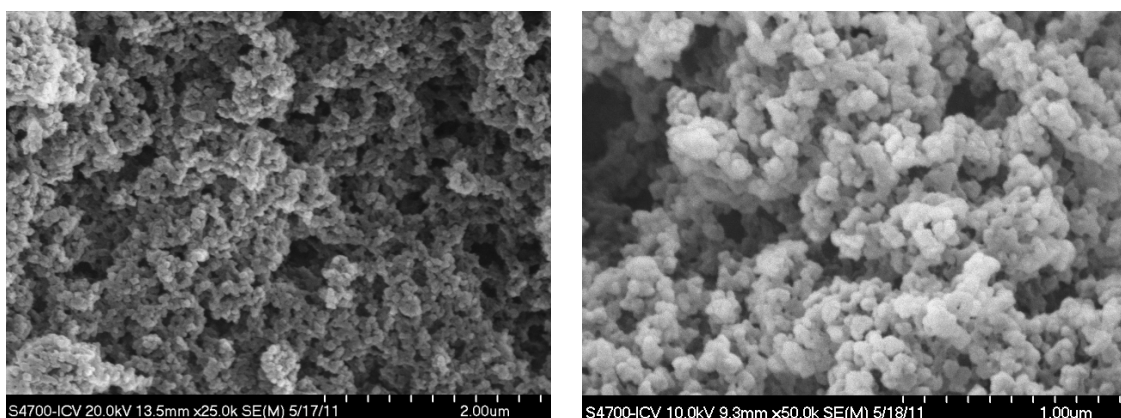
**Figura 46.** Distribución de poro determinado a partir de los datos de adsorción empleando el método BJH.<sup>507, 508</sup> a) Distribución del tamaño de poro. b) Distribución del volumen de poro.

**Tabla 36.** Distribución del volumen de poro agrupando los poros por grupos de tamaño.

Diámetro (nm)	< 5	5-10	10-15	15-20	20-30	30-50	50-100	>100
Distribución del volumen de poro (%vol.)	2,75	3,05	4,33	5,04	9,71	18,99	44,19	11,94

### c) Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

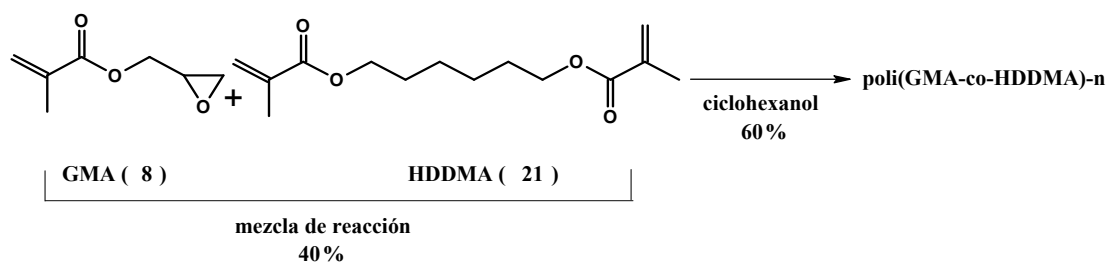
En la Figura 47 se muestran las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido del polímero poli(GMA-co-EGDMA)-11. La morfología encontrada es típica de agregados de partículas, con poros interconectados formados en el espacio interparticular.

**Figura 47.** Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido.

#### 5.3.3.1.2.A. Síntesis, superficie específica y porosidad de GMA (8) con HDDMA (21): poli(GMA-co-HDDMA)-n.

En este grupo de polimerización se mantiene el mismo monómero que en el grupo anterior, GMA (8), pero se sustituye el agente de entrecruzamiento metacrílico (EGDMA) (20), por otro agente de entrecruzamiento metacrílico (HDDMA) (21), que es más voluminoso y más flexible, para ver cómo influye en las propiedades texturales de los polímeros sintetizados (Esquema 49).

El agente de entrecruzamiento (21) ha sido empleado previamente en la síntesis de polímeros con diferentes aplicaciones como son: fabricación de piezas dentales,<sup>517</sup> inmovilización de  $\alpha$ -quimiotripsina<sup>518</sup> y la purificación de biomoléculas.<sup>519</sup>

**Esquema 49.** Síntesis de poli(GMA-co-HDDMA)-n.

Los resultados obtenidos en estas polimerizaciones aparecen reflejados en la Tabla 37.

**Tabla 37.** Síntesis y propiedades texturales de poli(GMA-co-HDDMA)-n (n= 1-12).

Entrada (n)	Mezcla de reacción		% Iniciador	T <sup>a</sup> (°C)	Rto. (%)	Volumen de poro (mL/g)	Tamaño de poro (nm)	Superficie BET (m <sup>2</sup> /g)	R
	% GMA	% HDDMA							
1	60	40	1% AIBN	50	91,9	0,15	28,9	21,6	1,34
2	60	40	5% AIBN	50	94,2	0,17	26,4	27,0	0,98
3	60	40	10% AIBN	50	97,0	0,13	23,5	23,6	1,20
4	60	40	1% AIBN	70	>99	-	-	-	-
5	60	40	5% AIBN	70	>99	-	-	-	-
6	60	40	10% AIBN	70	>99	-	-	-	-
7	70	30	1% AIBN	50	84,9	0,05	22,8	10,0	2,28
8	70	30	5% AIBN	50	94,3	0,06	19,5	13,8	1,41
9	70	30	10% AIBN	50	>99	0,09	23,9	16	1,49
10	70	30	1% AIBN	70	>99	-	-	-	-
11	70	30	5% AIBN	70	>99	-	-	-	-
12	70	30	10% AIBN	70	>99	-	-	-	-

%: Expresa el porcentaje en peso.

Rto.: Rendimiento de la polimerización.

R: Relación tamaño de poro/superficie específica.

-: Polímeros con una superficie menor a 1 m<sup>2</sup>/g.

Como se puede observar en la Tabla 37, sólo a 50°C se obtuvieron polímeros porosos con una superficie específica mayor a 1 m<sup>2</sup> / g, y en cualquier caso, con peores propiedades texturales a las que se obtuvieron con el crosslinker EGDMA (**20**). No obstante, se eligió el poli(GMA-co-HDDMA)-2 para llevar a cabo el proceso de inmovilización de enzimas, por lo que se realizó un estudio de la reproducibilidad del método de polimerización y una caracterización más en detalle de dicho polímero.

- **Estudio de reproducibilidad del método de polimerización.**

El estudio de reproducibilidad se llevó a cabo realizando 5 polimerizaciones en días diferentes, bajo las mismas condiciones, obteniéndose una elevada reproducibilidad del método de polimerización. En la Tabla 38 se muestran los resultados obtenidos en este estudio.

**Tabla 38.** Resultados obtenidos en el estudio de reproducibilidad del método de polimerización.

Polimerización	Rto. (%)	Volumen de poro (cm <sup>3</sup> /g)	Tamaño de poro (nm)	Superficie BET (m <sup>2</sup> /g)
1 <sup>a</sup>	94,2	0,17	26,4	27,0
2 <sup>a</sup>	97,0	0,15	27,3	25,9
3 <sup>a</sup>	95,1	0,12	28,1	23,6
4 <sup>a</sup>	92,0	0,17	22,8	26,7
5 <sup>a</sup>	94,3	0,20	26,3	28,1
<b>Desviación estándar</b>	1,6	0,03	1,8	1,5

Rto.: Rendimiento de la polimerización.

%: Representa el porcentaje en peso.

### 5.3.3.1.2.B. Caracterización de poli(GMA-co-HDDMA)-2.

#### 1. Análisis y caracterización de los grupos epóxido.

##### a) Determinación del grado de epoxidación del polímero.

Como se observa en la Tabla 39, el resultado de la valoración de los grupos epóxido concuerda con el margen teórico obtenido teniendo en cuenta la mezcla y el rendimiento de la polimerización.

**Tabla 39.** Grado de epoxidación de poli(GMA-co-HDDMA)-2.

Polímero	Grado de epoxidación (mmol epóxido/g de polímero)		
	Teórico <sup>a</sup>	Análisis elemental	Valoración <sup>b</sup>
Poli(GMA-co-HDDMA)-2	4.50-4.00	---- <sup>d</sup>	4.32

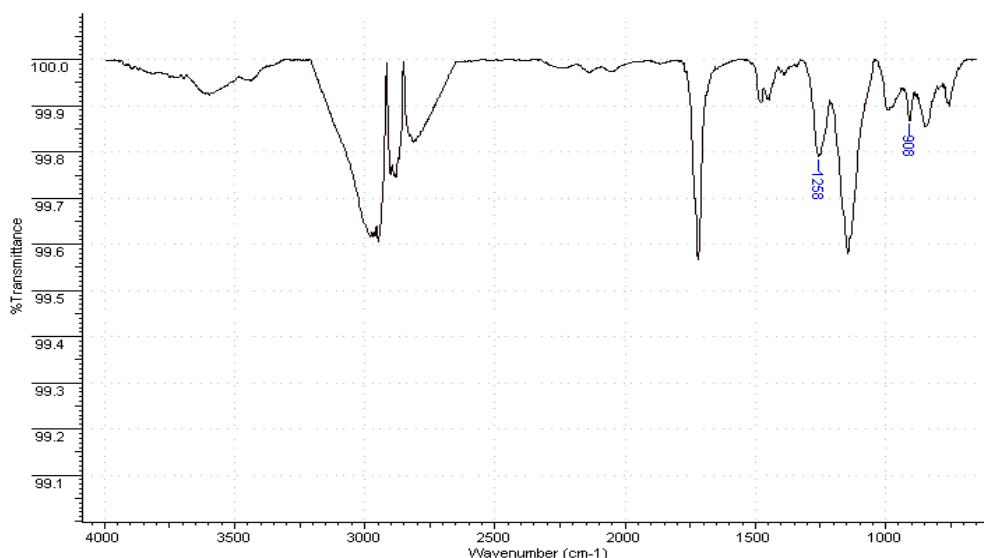
<sup>a</sup> Calculado teniendo en cuenta la mezcla de reacción y el rendimiento de la polimerización.

<sup>b</sup> Tritiación con bromuro de tetraetil amonio y ácido perclórico en presencia de cristal violeta.

<sup>d</sup> En estos casos no se realizó el cálculo del grado de epoxidación por análisis elemental debido a que tanto los monómeros como los crosslinker poseían hetero átomos.

##### b) Caracterización de los grupos epóxido mediante espectroscopia de infrarrojo (ATR/FTIR).

En la Figura 48 se muestra el espectro obtenido mediante ATR del polímero caracterizado. En el espectro se pueden observar las señales características de polímeros funcionalizados con grupos epóxido: una banda a 908  $\text{cm}^{-1}$  característica de la absorción por grupos epóxido y una banda a 1257  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a la vibración del grupo epóxido (banda de vibración C-O-C de un éter cíclico).



**Figura 48.** Espectro ATR del polímero poli(GMA-co-HDDMA)-2.

## 2. Comportamiento térmico: Análisis termogravimétrico (TGA).

En la Figura 49, se puede observar el análisis termogravimétrico del polímero caracterizado presenta una excelente estabilidad térmica hasta los 150° C, más allá de esta temperatura el material comienza a descomponerse y su pérdida de peso se hace evidente. Se observan dos etapas principales de pérdida de peso, la primera, no muy bien definida, parece ser una combinación de dos descomposiciones, a 150 y 252°C correspondiente a la liberación de grupos glicidiloxi y productos de polimerización metacrílica con menor grado de entrecruzamiento, y la segunda a una temperatura de 370°C, corresponde a la liberación de productos de polimerización metacrílica con mayor grado de entrecruzamiento.

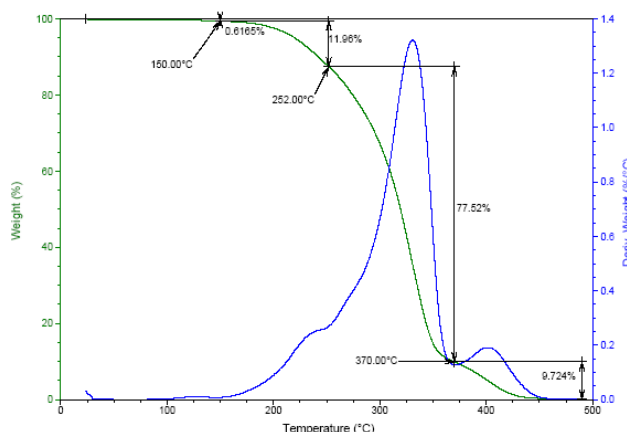


Figura 49. Análisis termogravimétrico del polímero poli(GMA-co-HDDMA)-2.

## 3. Caracterización textural.

Con las técnicas de adsorción-desorción de nitrógeno (empleando el método BJH <sup>507, 508</sup>) y microscopía electrónica de barrido se determinaron las propiedades texturales de los polímeros sintetizados.

### a) Isotherma de adsorción-desorción de nitrógeno.

La isoterma de adsorción-desorción de nitrógeno de este polímero es de tipo IV según la clasificación BET, <sup>506</sup> anteriormente mencionada, en la que se observa un ciclo de histéresis perteneciente al tipo H1, que se ha descrito en morfologías que tienen distribuciones de poro muy angostas o aglomerados de partículas esféricas de tamaños y distribuciones aproximadamente uniformes (Figura 50).

Las ramas de adsorción y desorción de la isoterma son paralelas y llegan a unirse aproximadamente en el punto donde comienza la zona intermedia lineal (P/Po: 0.7 → Radio de poro mesoporoso: 27.6 nm), presentando un pequeño ciclo de histéresis. Estos fenómenos de histéresis que aparecen en la zona de desorción de la multicapa están asociados a la condensación capilar en estructuras mesoporosas.



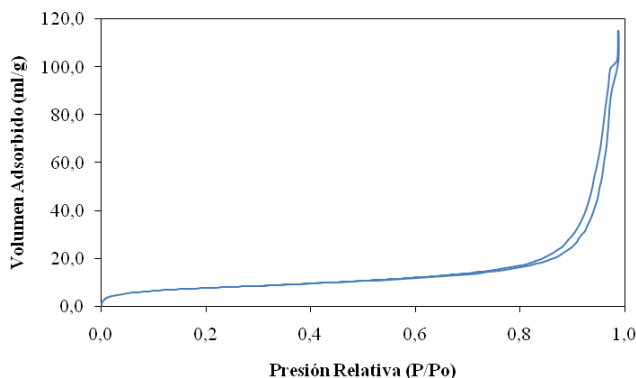


Figura 50. Isotherma de adsorción de nitrógeno del polímero poli(GMA-co-HDDMA)-2.

**b) Distribución de poro.**

En la Figura 51 se presenta la distribución de poro y en la Tabla 40 se representa la distribución del volumen de poro de este polímero. Como se puede observar este polímero es mayoritariamente mesoporoso con grande mesoporos.

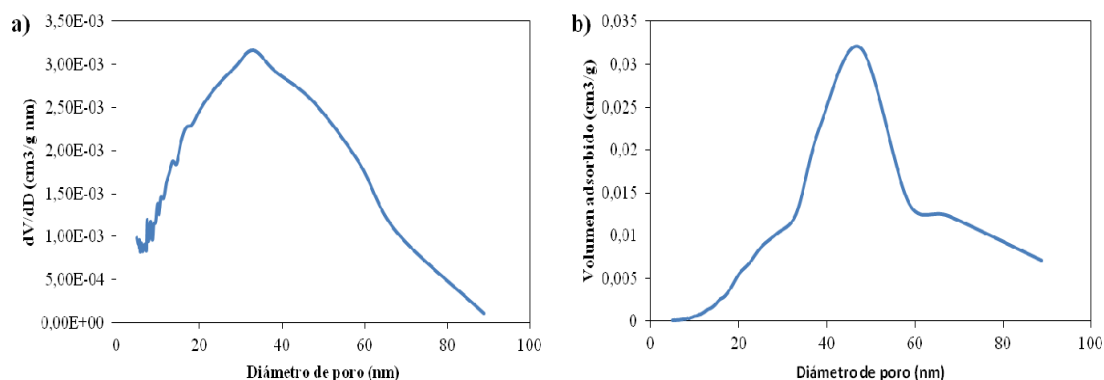


Figura 51. Distribución de poro determinado a partir de los datos de adsorción empleando el método BJH.<sup>507, 508</sup> a) Distribución del tamaño de poro. b) Distribución del volumen de poro.

Tabla 40. Distribución del volumen de poro agrupando los poros por grupos de tamaño.

Diámetro (nm)	< 5	5-10	10-15	15-20	20-30	30-50	50-100	>100
Distribución del volumen de poro (%vol.)	1,94	2,45	3,49	3,64	10,48	24,17	32,64	21,18

**c) Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).**

En la Figura 52 se muestran las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido del polímero poli(GMA-co-HDDMA)-2. La morfología encontrada es típica de agregados de partículas, con poros interconectados formados en el espacio interparticular.

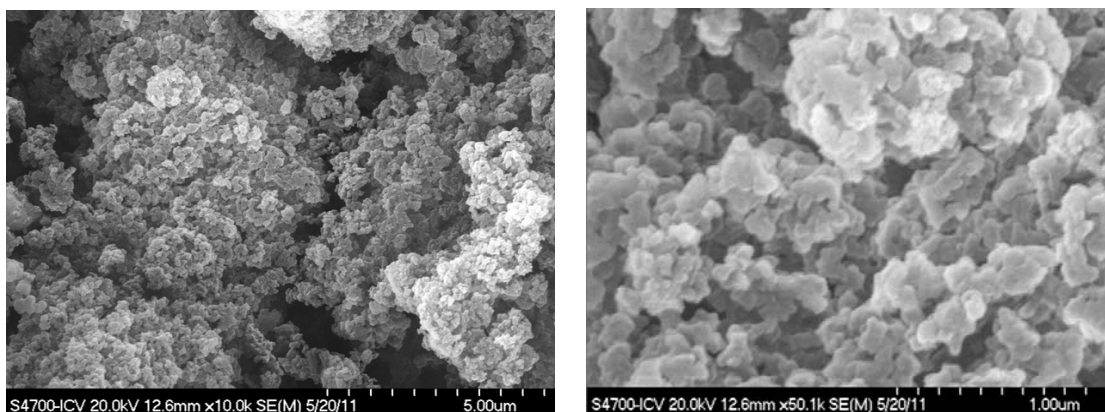
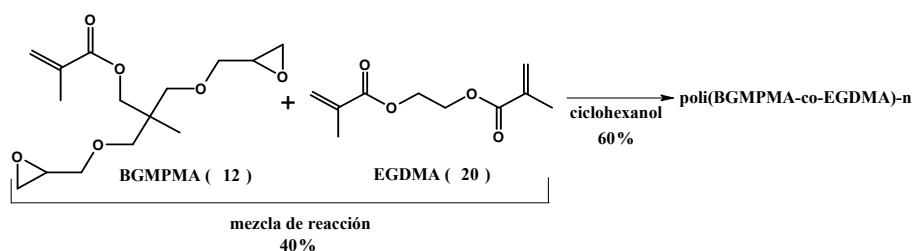


Figura 60. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido.

### 5.3.3.1.3.A. Síntesis, superficie específica y porosidad de {{2,2-bis[(glicidiloxi) metil]propil} metacrilato (BGMPMA) (12) con EGDMA (20): poli(BGMPMA-co-EGDMA)-n.

En este caso, se mantienen las mismas condiciones que en el caso del GMA (8), pero empleando el monómero metacrílico BGMPMA (12), que posee dos restos oxirano (Esquema 50). Con este monómero también se llevaron a cabo las polimerizaciones empleando como agente de entrecruzamiento el HDDMA (21), pero en este caso, se obtuvieron polímeros no porosos con una superficie específica inferior a  $1 \text{ m}^2 / \text{g}$ .



Esquema 50. Síntesis de poli(BGMPMA-co-EGDMA)-n

Los resultados obtenidos en estas polimerizaciones aparecen representados en la Tabla 41.

Lo primero que observamos es una bajada en los rendimientos de reacción, y que al aumentar el porcentaje de monómero, aumenta el tamaño de poro, obteniéndose los mejores resultados con una mezcla de reacción 70% monómero y 30% crosslinker.

Sin embargo, en lo que respecta a la temperatura, el comportamiento ha sido diferente. Cuando se emplea un porcentaje relativo de monómero y de agente de entrecruzamiento 60/40, la temperatura que da lugar a polímeros con mejor relación tamaño de poro y la superficie específica es de  $70^\circ\text{C}$ , mientras que cuando el porcentaje relativo de monómero y de agente de entrecruzamiento es de 70/30, la temperatura óptima es de  $50^\circ\text{C}$ .

**Tabla 41.** Síntesis y propiedades texturales de poli(BGMPMA-*co*-EGDMA)-n (n= 1-12).

Entrada (n)	Mezcla de reacción		% Iniciador	T <sup>a</sup> (°C)	Rto. (%)	Volumen de poro (cm <sup>3</sup> /g)	Tamaño de poro (nm)	Superficie BET (m <sup>2</sup> /g)	R
	% BGMPMA (12)	% crosslinker (EGDMA)							
1	60	40	1% AIBN	50	83,2	0,40	22,7	73,0	0,31
2	60	40	5% AIBN	50	86,0	0,39	22,2	73,9	0,30
3	60	40	10% AIBN	50	82,9	0,40	22,0	76,2	0,29
4	60	40	1% AIBN	70	87,4	0,37	24,6	62,0	0,40
5	60	40	5% AIBN	70	88,8	0,41	26,9	62,5	0,43
6	60	40	10% AIBN	70	87,1	0,39	23,8	67,0	0,36
7	70	30	1% AIBN	50	81,8	0,25	27,3	38,2	0,71
8	70	30	5% AIBN	50	84,2	0,33	30,4	44,8	0,68
9	70	30	10% AIBN	50	83,0	0,16	24,7	19,5	1,27
10	70	30	1% AIBN	70	86,7	0,27	27,5	39,8	0,69
11	70	30	5% AIBN	70	89,4	-	-	-	-
12	70	30	10% AIBN	70	87,3	-	-	-	-

% Expresa el porcentaje en peso.

Rto.: Rendimiento de la polimerización.

R: Relación tamaño de poro/superficie específica.

-: Polímeros con una superficie menor a 1 m<sup>2</sup>/g.

De estos polímeros, el que presenta mejores propiedades texturales es la entrada n= 8, por lo que es el elegido para llevar a cabo las pruebas de inmovilización de enzimas. A continuación se expone un estudio de reproducibilidad del método de polimerización y una caracterización más detallada de este polímero.

- **Estudio de reproducibilidad del método de polimerización.**

El estudio de reproducibilidad se llevó a cabo realizando 5 polimerizaciones en días diferentes, bajo las mismas condiciones, obteniéndose una elevada reproducibilidad (Tabla 42).

**Tabla 42.** Resultados obtenidos en el estudio de reproducibilidad de la técnica de polimerización.

Polimerización	Rto. (%)	Volumen de poro (cm <sup>3</sup> /g)	Tamaño de poro (nm)	Superficie BET (m <sup>2</sup> /g)
1 <sup>a</sup>	84,2	0,33	30,4	44,8
2 <sup>a</sup>	86,4	0,40	30,8	48,5
3 <sup>a</sup>	84,0	0,36	29,3	46,3
4 <sup>a</sup>	82,9	0,31	28,9	47,1
5 <sup>a</sup>	85,1	0,35	31,1	42,8
Desviación estándar	1,2	0,03	0,9	2,0

### 5.3.3.1.3.B. Caracterización de poli(BGMPMA-*co*-EGDMA)-8.

#### 1. Análisis y caracterización de los grupos epóxido.

##### a) Determinación del grado de epoxidación del polímero.

Como se observa en la Tabla 43, el resultado de la valoración de los grupos epóxido concuerda con el margen teórico obtenido teniendo en cuenta la mezcla y el rendimiento de la polimerización.

**Tabla 43.** Grado de poli(BGMPMA-co-EGDMA)-n

Polímero	Grado de epoxidación (mmol epóxido/g de polímero)		
	Teórico <sup>a</sup>	Análisis elemental	Valoración <sup>b</sup>
<b>Poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8</b>	5.50-4.30	---- <sup>d</sup>	4.55

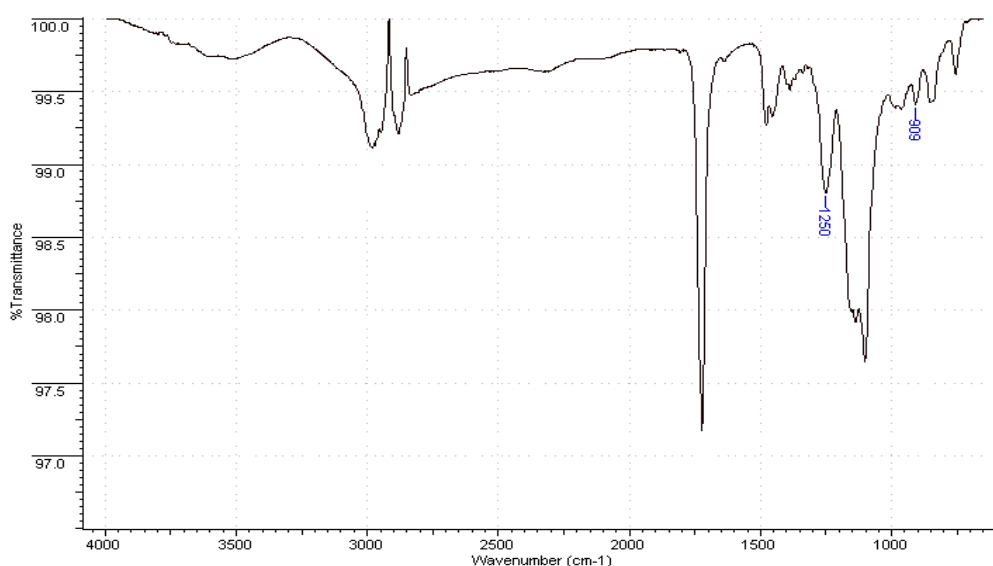
<sup>a</sup> Calculado teniendo en cuenta la mezcla de reacción y el rendimiento de la polimerización.

<sup>b</sup> Tritiación con bromuro de tetraetil amonio y ácido perclórico en presencia de cristal violeta.

<sup>d</sup> En estos casos no se realizó el cálculo del grado de epoxidación por análisis elemental debido a que tanto los monómeros como los crosslinker poseían hetero átomos.

### b) Caracterización de los grupos epóxido mediante espectroscopia de infrarrojo (ATR/FT-IR).

En la Figura 53 se muestra el espectro obtenido mediante ATR del polímero caracterizado. En el espectro se pueden observar las señales características de polímeros funcionalizados con grupos epóxido: una banda a  $909\text{ cm}^{-1}$  característica de la absorción por grupos epóxido y una banda a  $1250\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la vibración del grupo epóxido (banda de vibración C-O-C de un éter cíclico).

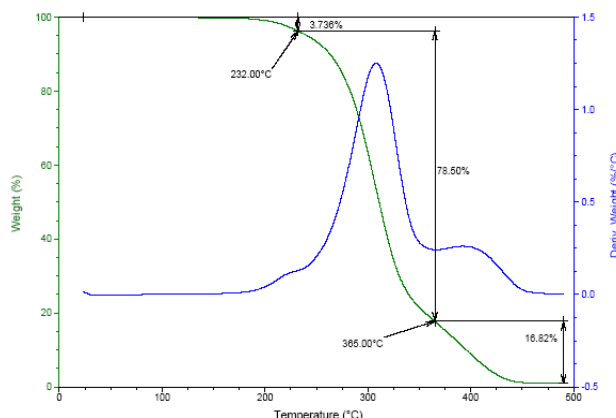


**Figura 53.** Espectro ATR del polímero poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8.

### 2. Comportamiento térmico: Análisis termogravimétrico (TGA).

En la Figura 54, se puede observar el análisis termogravimétrico del polímero caracterizado presenta una excelente estabilidad térmica hasta los  $150^{\circ}\text{C}$ , más allá de esta temperatura el material comienza a descomponerse y su pérdida de peso se hace evidente. Se observan dos etapas principales de pérdida de peso, la primera, no muy bien definida, parece ser una combinación de dos descomposiciones, a  $150$  y  $232^{\circ}\text{C}$  correspondiente a la liberación de grupos bis [(glicidilo) metil] propanoxi y productos de polimerización metacrílica con menor

grado de entrecruzamiento, y la segunda a una temperatura de 365°C, corresponde a la liberación de productos de polimerización metacrílica con mayor grado de entrecruzamiento.



**Figura 54.** Análisis termogravimétrico del polímero poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8.

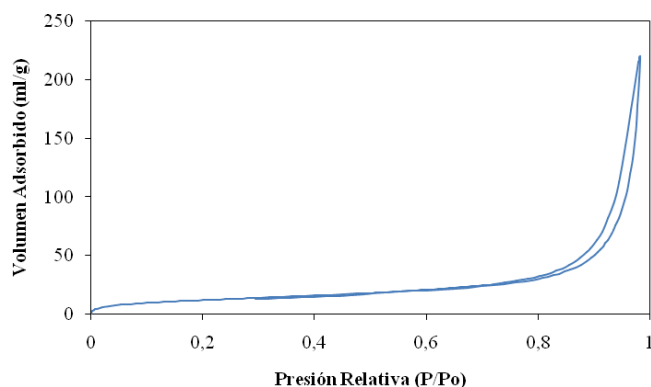
### 3. Caracterización textural.

Con las técnicas de adsorción-desorción de nitrógeno (empleando el método BJH <sup>507, 508</sup>) y microscopía electrónica de barrido se determinaron las propiedades texturales de los polímeros sintetizados.

#### a) Isoterma de adsorción-desorción de nitrógeno.

La isoterma de adsorción-desorción de nitrógeno de este polímero es de tipo IV según la clasificación BET, <sup>506</sup> anteriormente mencionada, en la que se observa un ciclo de histéresis perteneciente al tipo H1, que se ha descrito en morfologías que tienen distribuciones de poro muy angostas o aglomerados de partículas esféricas de tamaños y distribuciones aproximadamente uniformes (Figura 55).

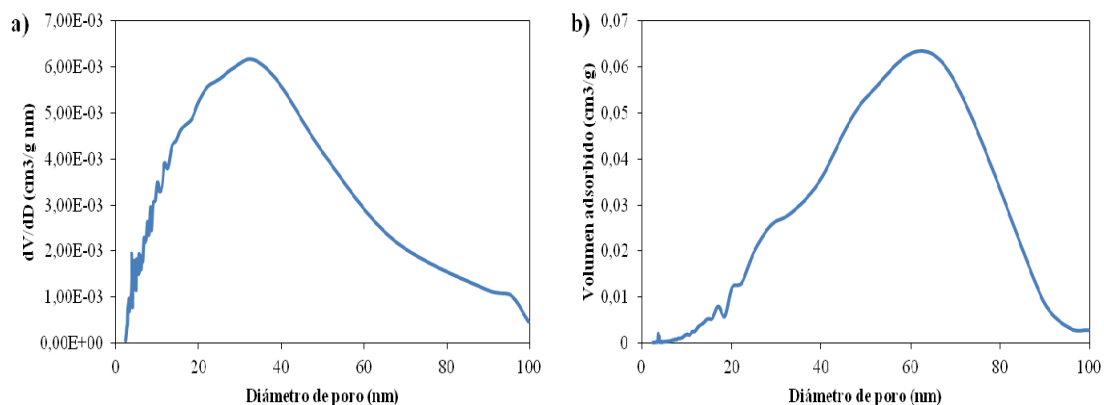
Las ramas de adsorción y desorción de la isoterma son paralelas y llegan a unirse aproximadamente en el punto donde comienza la zona intermedia lineal ( $P/P_0$ : 0.78  $\rightarrow$  Radio de poro mesoporoso: 39.3 nm), presentando un pequeño ciclo de histéresis. Estos fenómenos de histéresis que aparecen en la zona de desorción de la multicapa están asociados a la condensación capilar en estructuras mesoporosas.



**Figura 55.** Isoterma de adsorción de nitrógeno del polímero poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8.

### b) Distribución de poro.

En la Figura 56 se presenta la distribución de poro y en la Tabla 44 se representa la distribución del volumen de poro de este polímero. Como se puede observar, el polímero es mayoritariamente mesoporoso, y los mesoporos de gran tamaño contribuyen de forma importante al volumen de poro del polímero.



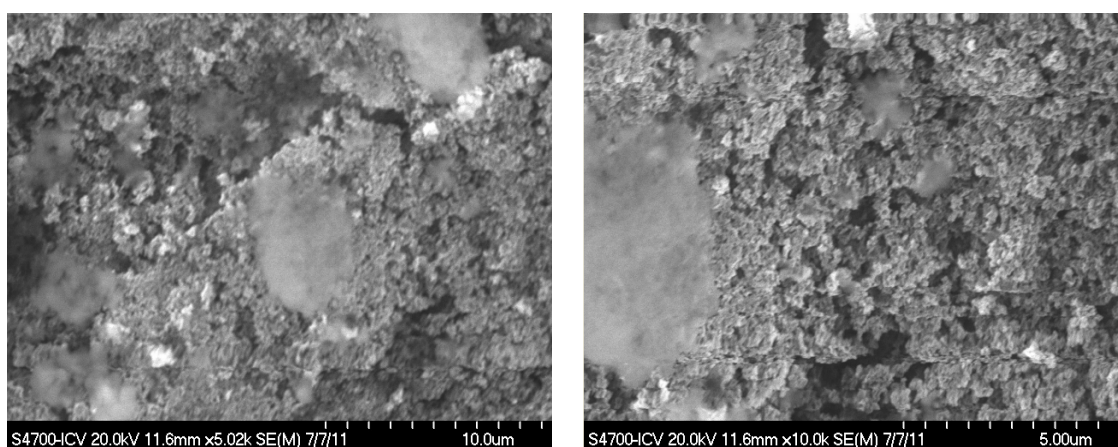
**Figura 56.** Distribución de poro determinado a partir de los datos de adsorción empleando el método BJH.<sup>507, 508</sup> a) Distribución del tamaño de poro. b) Distribución del volumen de poro.

**Tabla 44.** Distribución del volumen de poro agrupando los poros por grupos de tamaño.

Diámetro (nm)	< 5	5-10	10-15	15-20	20-30	30-50	50-100	>100
Distribución del volumen de poro (%vol.)	2,19	2,91	4,45	5,07	10,74	19,52	45,51	9,62

### c) Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

En la Figura 57 se muestran las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido del polímero poli(BGMPMA-*co*-EGDMA)-8. La morfología encontrada es típica de agregados de partículas, con poros interconectados formados en el espacio interparticular.

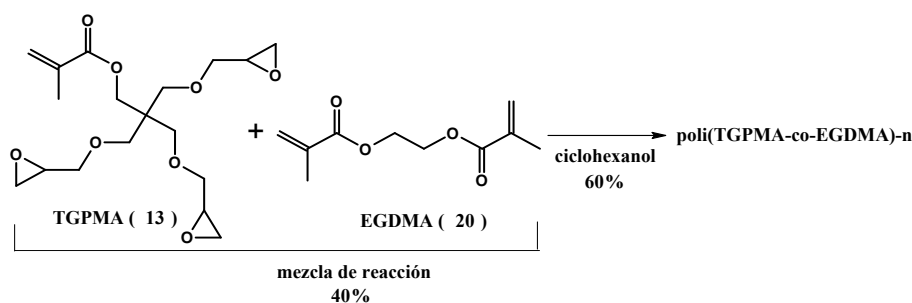


**Figura 57.** Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido.

### 5.3.3.1.4.A. Síntesis, superficie específica y porosidad de triglicidil pentaeritritil metacrilato (TGPMA) (13) con EGDMA (20): poli(TGPMA-co-EGDMA)-n.

Finalmente, se llevó a cabo las polimerizaciones con el monómero metacrílico funcionalizado con tres grupos epóxidos, el TGPMA (13) (Esquema 51), manteniendo las mismas condiciones empleadas en las polimerizaciones llevadas a cabo con los monómeros funcionalizados con uno y dos grupos epóxido (Tabla 45).

Con este monómero también se llevaron a cabo las polimerizaciones empleando como agente de entrecruzamiento el HDDMA (21), pero en este caso, también se obtuvieron polímeros no porosos con una superficie específica inferior a  $1\text{m}^2/\text{g}$ .



**Esquema 51.** Síntesis de poli(TGPMA-co-EGDMA)-n.

Analizando los resultados obtenidos en estas polimerizaciones, se pueden destacar las siguientes conclusiones:

- Los rendimientos obtenidos en estas polimerizaciones, son similares a los obtenidos con el monómero funcionalizado con dos grupos epóxido.
- No se ha observado un comportamiento regular entre la relación monómero/agente de entrecruzamiento y la variación en el tamaño de poro y superficie específica de los polímeros sintetizados. A  $50^{\circ}\text{C}$ , al aumentar el porcentaje de monómero se aumenta tanto el tamaño de poro como la superficie específica, mientras que a  $70^{\circ}\text{C}$ , al aumentar el porcentaje de monómero, los valores de superficie específica disminuyen drásticamente. Los polímeros con mejores propiedades texturales se han obtenido con una mezcla de reacción de 70/30.
- Con relación al iniciador radicalario, se observan dos tendencias dependiendo de la temperatura empleada. A  $50^{\circ}\text{C}$ , al aumentar el porcentaje de iniciador radicalario aumenta tanto el tamaño de poro como la superficie específica, mientras que a  $70^{\circ}\text{C}$ , el tamaño de poro no presenta un comportamiento regular y la superficie específica disminuye al aumentar el porcentaje de iniciador. El porcentaje de iniciador que da lugar a los mejores resultados está entre 5 y 10%.
- Con respecto a la temperatura de polimerización, se observan dos comportamientos dependiendo del porcentaje relativo de monómero y agente de entrecruzamiento. Mientras

que para un porcentaje relativo 60:40, al aumentar la temperatura aumenta el tamaño de poro y la superficie específica, para un porcentaje relativo de 70:30, al aumentar la temperatura aumenta el tamaño de poro pero la superficie específica disminuye.

**Tabla 45.** Síntesis y propiedades texturales de poli(TGPMA-co-EGDMA)-n (n= 1-12).

Entrada (n)	Mezcla de reacción		% Iniciador	T <sup>a</sup> (°C)	Rto. (%)	Volumen de poro (cm <sup>3</sup> /g)	Tamaño de poro (nm)	Superficie BET (m <sup>2</sup> /g)	R
	% TGPMA (13)	% crosslinker (EGDMA)							
1	60	40	1% AIBN	50	68,9	0,11	22,7	19,9	1,14
2	60	40	5% AIBN	50	88,0	0,21	23,6	37,3	0,63
3	60	40	10% AIBN	50	90,3	0,26	24,0	45,6	0,53
4	60	40	1% AIBN	70	88,7	0,37	24,0	63,3	0,38
5	60	40	5% AIBN	70	91,4	0,36	24,6	61,1	0,40
6	60	40	10% AIBN	70	88,8	0,29	20,1	60,4	0,33
7	70	30	1% AIBN	50	80,0	0,19	25,3	30,8	0,82
8	70	30	5% AIBN	50	88,3	0,24	26,0	37,3	0,70
9	70	30	10% AIBN	50	86,5	0,29	26,8	44,1	0,61
10	70	30	1% AIBN	70	86,2	0,04	37,9	3,9	9,72
11	70	30	5% AIBN	70	86,9	-	-	-	-
12	70	30	10% AIBN	70	85,7	-	-	-	-

%: Expresa el porcentaje en peso.

Rto.: Rendimiento de la polimerización.

R: Relación tamaño de poro/superficie específica.

- : Polímeros con una superficie menor a 1 m<sup>2</sup>/g.

De estos polímeros, el que presenta mejores propiedades texturales es la entrada n= 9, por lo que es el elegido para llevar a cabo las pruebas de inmovilización de enzimas. A continuación se expone un estudio de reproducibilidad del método de polimerización y una caracterización más detallada de este polímero.

- **Estudio de reproducibilidad del método de polimerización.**

El estudio de reproducibilidad se llevó a cabo realizando 5 polimerizaciones en días diferentes, bajo las mismas condiciones, obteniéndose una elevada reproducibilidad del método de polimerización. En la Tabla 46 se muestran los resultados obtenidos en este estudio.

**Tabla 46.** Resultados obtenidos en el estudio de reproducibilidad de la técnica de polimerización.

Polimerización	Rto. (%)	Volumen de poro (cm <sup>3</sup> /g)	Tamaño de poro (nm)	Superficie BET (m <sup>2</sup> /g)
1 <sup>a</sup>	86,5	0,29	26,8	44,1
2 <sup>a</sup>	80,0	0,40	24,3	46,8
3 <sup>a</sup>	83,3	0,36	27,9	41,3
4 <sup>a</sup>	88,4	0,31	25,1	42,7
5 <sup>a</sup>	84,6	0,35	26,9	44,0
<b>Desviación estándar</b>	2,9	0,04	1,3	1,8

Rto.: Rendimiento de la polimerización.

%: Representa el porcentaje en peso.



### 5.3.3.1.4.B. Caracterización de poli(TGPMA-*co*-EGDMA)-9.

#### 1. Análisis y caracterización de los grupos epóxido.

##### a) Determinación del grado de epoxidación del polímero.

Como se observa en la Tabla 47, el resultado de la valoración de los grupos epóxido concuerda con el margen teórico obtenido teniendo en cuenta la mezcla y el rendimiento de la polimerización.

**Tabla 47.** Grado de epoxidación de poli(TGPMA-*co*-EGDMA)-9.

Polímero	Grado de epoxidación (mmol epóxido/g de polímero)		
	Teórico <sup>a</sup>	Análisis elemental	Valoración <sup>b</sup>
<b>Poli(TGPMA-<i>co</i>-EGDMA)-9</b>	6.50-5.20	---- <sup>d</sup>	5.28

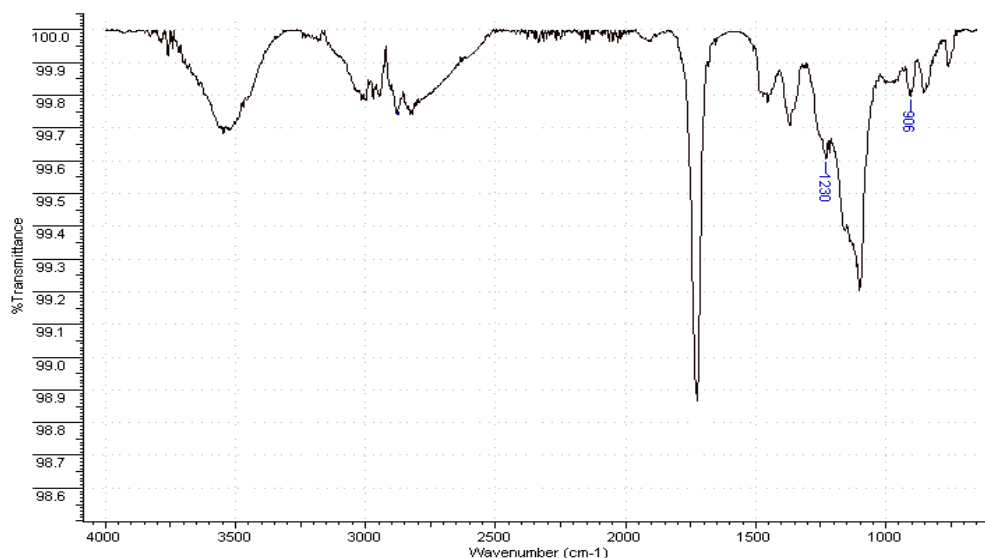
<sup>a</sup> Calculado teniendo en cuenta la mezcla de reacción y el rendimiento de la polimerización.

<sup>b</sup> Tritiación con bromuro de tetraetil amonio y ácido perclórico en presencia de cristal violeta.

<sup>d</sup> En estos casos no se realizó el cálculo del grado de epoxidación por análisis elemental debido a que tanto los monómeros como los crosslinker poseían hetero átomos.

##### b) Caracterización de los grupos epóxido mediante espectroscopia de infrarrojo (ATR/FT-IR).

En la Figura 58 se muestra el espectro obtenido mediante ATR del polímero caracterizado. En el espectro se pueden observar las señales características de polímeros funcionalizados con grupos epóxido: una banda a 906 cm<sup>-1</sup> característica de la absorción por grupos epóxido y una banda a 1230 cm<sup>-1</sup> correspondiente a la vibración del grupo epóxido (banda de vibración C-O de un éter cíclico).



**Figura 58.** Espectro ATR/ del polímero poli(TGPMA-*co*-EGDMA)-9.

## 2. Comportamiento térmico: Análisis termogravimétrico (TGA).

En la Figura 59, se puede observar el análisis termogravimétrico del polímero caracterizado presenta una excelente estabilidad térmica hasta los 160° C, más allá de esta temperatura el material comienza a descomponerse y su pérdida de peso se hace evidente. Se observan dos etapas principales de pérdida de peso, la primera a 160°C, parece ser una combinación de dos descomposiciones, correspondientes a la liberación de grupos triglicidil pentaeritritiloxi y productos de polimerización metacrílica con menor grado de entrecruzamiento, y la segunda a una temperatura de 355°C, corresponde a la liberación de productos de polimerización metacrílica con mayor grado de entrecruzamiento.

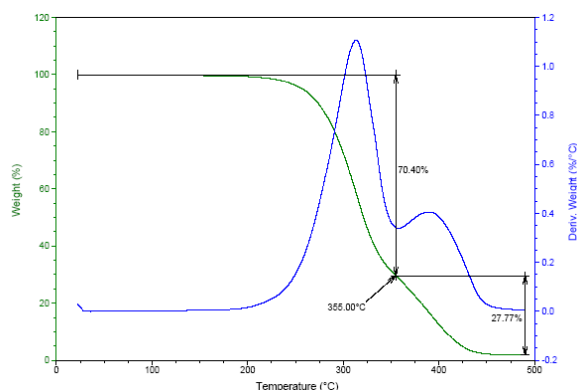


Figura 59. Análisis termogravimétrico del polímero poli(TGPMA-co-EGDMA)-9.

## 3. Caracterización textural.

Con las técnicas de adsorción-desorción de nitrógeno (empleando el método BJH <sup>507, 508</sup>) y microscopía electrónica de barrido se determinaron las propiedades texturales de los polímeros sintetizados.

### a) Isotherma de adsorción-desorción de nitrógeno.

La isoterma de adsorción-desorción de nitrógeno de este polímero es de tipo IV según la clasificación BET, <sup>506</sup> anteriormente mencionada, en la que se observa un ciclo de histéresis perteneciente al tipo H1, que se ha descrito en morfologías que tienen distribuciones de poro muy angostas o aglomerados de partículas esféricas de tamaños y distribuciones aproximadamente uniformes (Figura 60).

Las ramas de adsorción y desorción de la isoterma son paralelas y llegan a unirse aproximadamente en el punto donde comienza la zona intermedia lineal ( $P/P_0$ : 0.80  $\rightarrow$  Radio de poro mesoporoso: 43.7 nm), presentando un pequeño ciclo de histéresis. Estos fenómenos de histéresis que aparecen en la zona de desorción de la multicapa están asociados a la condensación capilar en estructuras mesoporosas.

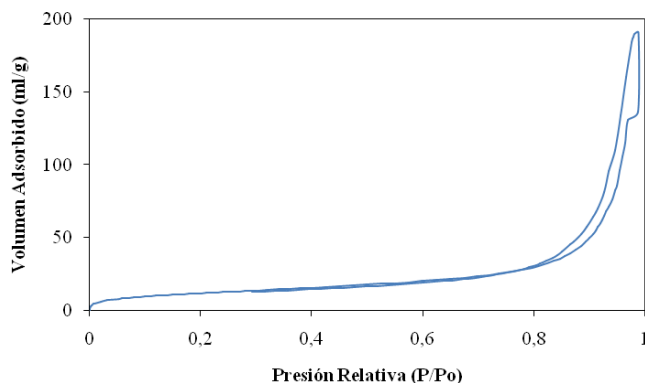


Figura 60. Isotherma de adsorción de nitrógeno del polímero poli(TGPMA-co-EGDMA)-9.

**b) Distribución de poro.**

En la Figura 61 se presenta la distribución de poro y en la Tabla 48 se representa la distribución del volumen de poro de este polímero. Como se puede observar este polímero es fundamentalmente mesoporoso y los mesoporos de gran tamaño contribuyen significativamente al volumen de poro.

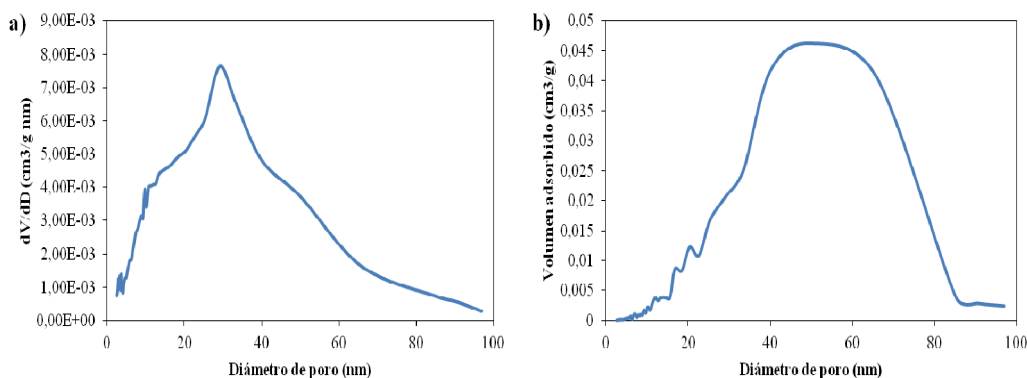


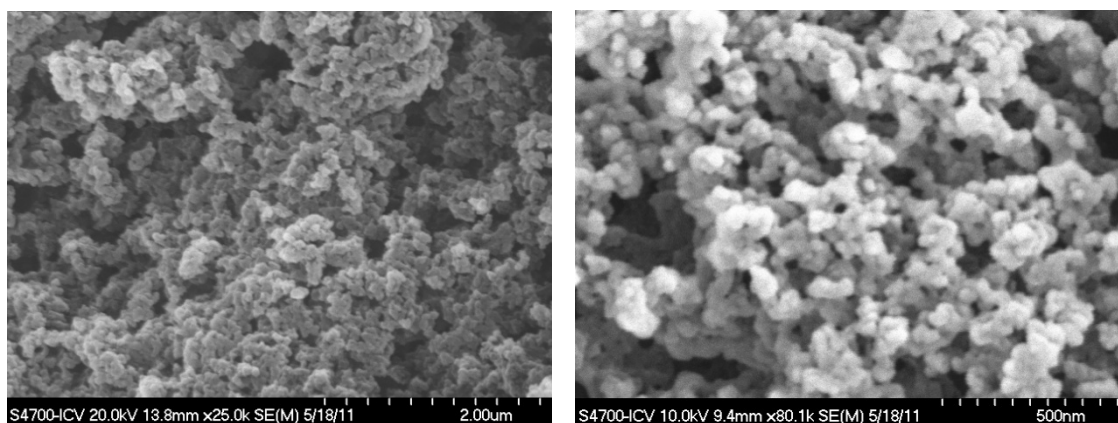
Figura 61. Distribución de poro determinado a partir de los datos de adsorción empleando el método BJH.<sup>507, 508</sup> a) Distribución del tamaño de poro. b) Distribución del volumen de poro.

Tabla 48. Distribución del volumen de poro agrupando los poros por grupos de tamaño.

Diámetro (nm)	< 5	5-10	10-15	15-20	20-30	30-50	50-100	>100
Distribución del volumen de poro (%vol.)	2,49	3,50	5,18	6,01	12,38	20,19	47,22	3,03

**c) Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).**

En la Figura 62 se muestran las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido del polímero poli(TGPMA-co-EGDMA)-9. La morfología encontrada es típica de agregados de partículas, con poros interconectados formados en el espacio interparticular.



**Figura 62.** Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido.

### 5.3.3.1.5. Resumen comparativo de las polimerizaciones de metacriloxiranos con agente de entrecruzamiento metacrílico.

- El monómero que origina los polímeros con mejores propiedades texturales es el  $\{2,2\text{-bis}[(\text{glicidiloxi})\text{metil}]\text{propil}\}$  metacrilato (**12**), a continuación el triglicidil pentaeritritil metacrilato (**13**) y, por último, el glicidil metacrilato (GMA) (**8**).
- El agente de entrecruzamiento que origina los polímeros con mejores propiedades físicas es el EGDMA.
- Los porcentajes relativos de monómero y agente de entrecruzamiento que dan lugar a los mejores resultados varían con el empleo de los distintos monómeros. Es de 70/30 para los monómeros con 2 y 3 grupos oxiranos y de 60/40 para el monómero de un grupo oxirano.
- El mejor porcentaje de iniciador radicalario empleado oscila entre el 5-10% respecto a la mezcla de reacción.
- La temperatura de polimerización ideal disminuye al incrementarse la funcionalización de los monómeros empleados.
- El rendimiento obtenido este grupo de polimerizaciones no presenta un comportamiento regular.

### 5.3.3.2. Síntesis, superficie específica y porosidad de polímeros con metacriloxiranos y monómero metacrílico con un grupo hidroxilo con agente de entrecruzamiento metacrílico.

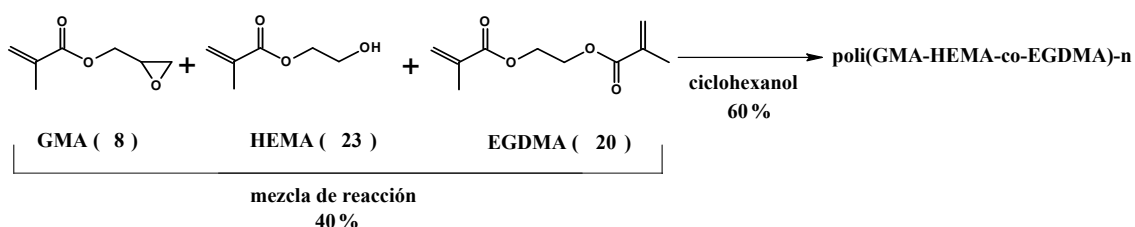
Con el fin de aumentar la hidrofiliidad de estos polímeros, decidimos introducir en la mezcla de polimerización, un monómero metacrílico funcionalizado con un grupo hidroxilo, el hidroxietil metacrilato (HEMA) (**23**).

Este monómero HEMA, ha sido empleado previamente por varios grupos de investigación, en la síntesis de diferentes polímeros.<sup>253, 386, 403, 409, 520-523</sup> De estos estudios previos, solamente uno,<sup>520</sup> reporta la síntesis de poli(GMA-HEMA-*co*-EGDMA), sintetizado

como microesferas para la inmovilización de la lipasa de *Candida rugosa*. De los restantes, unos polimerizan el HEMA (23) con EGDMA,<sup>253, 523</sup> otro con metil metacrilato (MMA),<sup>386</sup> otros con GMA,<sup>403, 409, 521</sup> y otro con metil amidofenilamida.<sup>522</sup> Todos estos polímeros reportados han sido empleados en la inmovilización de diferentes enzimas.

### 5.3.3.2.1.A. Síntesis, superficie específica y porosidad de GMA (8) y hidroxietil metacrilato (HEMA) (23) con EGDMA (20): poli(GMA-HEMA-co-EGDMA)-n.

Se mantienen las condiciones de reacción descritas en los grupos anteriores, lo único que varía es que ahora el 60% de monómero estará formado por un 30% de GMA (8) y un 30% de HEMA (23), y el 70% de monómero estará compuesto por un 35% de GMA y un 35% de HEMA (Esquema 52). Los resultados obtenidos quedan reflejados en la Tabla 49.



Esquema 52. Síntesis de poli(GMA-HEMA-co-EGDMA)-n.

Analizando los resultados obtenidos en estas polimerizaciones, se puede observar que los rendimientos de reacción siguen siendo excelentes.

En relación al porcentaje de monómero y agente de entrecruzamiento en la mezcla de reacción, se observa que al aumentar el porcentaje de mezcla de monómeros, aumenta el tamaño de poro y disminuye la superficie específica.

La introducción de un monómero funcionalizado con grupos hidroxilo, además de aumentar la hidrofilia de los polímeros sintetizados, permite mejorar las propiedades texturales de los polímeros, aumentándose tanto el tamaño de poro como la superficie específica en la mayoría de los casos.

En este caso, no se ha observado un comportamiento regular entre el porcentaje de iniciador radicalario y la variación en el tamaño de poro y superficie específica de los polímeros sintetizados. Al aumentar el porcentaje de iniciador, aumenta el rendimiento de la polimerización.

En lo referente a la temperatura de reacción, solo comentar que al aumentar el porcentaje de monómero en la mezcla de reacción, solo se obtienen polímeros porosos a 50°C.

**Tabla 49.** Síntesis y propiedades texturales de poli(GMA-HEMA-co-EGDMA)-n (n= 1-12).

Entrada (n)	Mezcla de reacción			% Iniciador	T <sup>a</sup> (°C)	Rto. (%)	Volumen de poro (cm <sup>3</sup> /g)	Tamaño de poro (nm)	Superficie BET (m <sup>2</sup> /g)	R
	% GMA	% monómero (HEMA)	% crosslinker (EGDMA)							
1	30	30	40	1% AIBN	50	91,8	0,27	25,7	43,9	0,59
2	30	30	40	5% AIBN	50	95,2	0,33	22,1	62,7	0,35
3	30	30	40	10% AIBN	50	95,5	0,36	23,6	62,5	0,38
4	30	30	40	1% AIBN	70	90,0	0,27	20,5	55,7	0,37
5	30	30	40	5% AIBN	70	>99	0,25	25,3	41,0	0,62
6	30	30	40	10% AIBN	70	> 99	0,21	23,2	38,2	0,61
7	35	35	30	1% AIBN	50	93,9	0,20	27,2	30,5	0,89
8	35	35	30	5% AIBN	50	95,7	0,21	25,9	33,8	0,77
9	35	35	30	10% AIBN	50	96,0	0,27	27,1	33,8	0,80
10	35	35	30	1% AIBN	70	> 99	-	-	-	-
11	35	35	30	5% AIBN	70	> 99	-	-	-	-
12	35	35	30	10% AIBN	70	> 99	-	-	-	-

%: Expresa el porcentaje en peso;

Rto.: Rendimiento de la polimerización.

R: Relación de tamaño de poro /superficie específica;

-: Polímeros con una superficie menor a 1 m<sup>2</sup>/g.

De estos polímeros, el que presenta mejores propiedades texturales es la entrada n= 9, por lo que, el poli(GMA-HEMA-co-EGDMA)-9 es el elegido para llevar a cabo las pruebas de inmovilización de enzimas. A continuación se expone un estudio de reproducibilidad del método de polimerización y una caracterización más detallada de este polímero.

- **Estudio de reproducibilidad del método de polimerización.**

El estudio de reproducibilidad se llevó a cabo realizando 5 polimerizaciones en días diferentes, bajo las mismas condiciones, obteniéndose una elevada reproducibilidad del método de polimerización. En la Tabla 50 se muestran los resultados obtenidos en este estudio.

**Tabla 50.** Resultados obtenidos en el estudio de reproducibilidad del método de polimerización.

Polimerización	Rto. (%)	Volumen de poro (cm <sup>3</sup> /g)	Tamaño de poro (nm)	Superficie BET (m <sup>2</sup> /g)
1 <sup>a</sup>	96,0	0,27	27,1	33,8
2 <sup>a</sup>	95,6	0,22	28,3	33,0
3 <sup>a</sup>	92,5	0,31	27,6	34,7
4 <sup>a</sup>	98,3	0,28	25,9	35,2
5 <sup>a</sup>	97,1	0,23	25,1	30,8
<b>Desviación estándar</b>	1,9	0,03	1,2	1,6

Rto.: Rendimiento de la polimerización.

%: Representa el porcentaje en peso.

### 5.3.3.2.1.B. Caracterización de poli(GMA-HEMA-co-EGDMA)-9.

#### 1. Análisis y caracterización de los grupos epóxido.

##### a) Determinación del grado de epoxidación del polímero.

Como se observa en la Tabla 51, el resultado de la valoración de los grupos epóxido concuerda con el margen teórico obtenido teniendo en cuenta la mezcla y el rendimiento de la polimerización.

**Tabla 51.** Grado de epoxidación de poli(GMA-HEMA-co-EGDMA)-9.

Polímero	Grado de epoxidación (mmol epóxido/g de polímero)		
	Teórico <sup>a</sup>	Análisis elemental	Valoración <sup>b</sup>
Poli(GMA-HEMA-co-EGDMA)-9	2.50-2.30	---- <sup>d</sup>	2.38

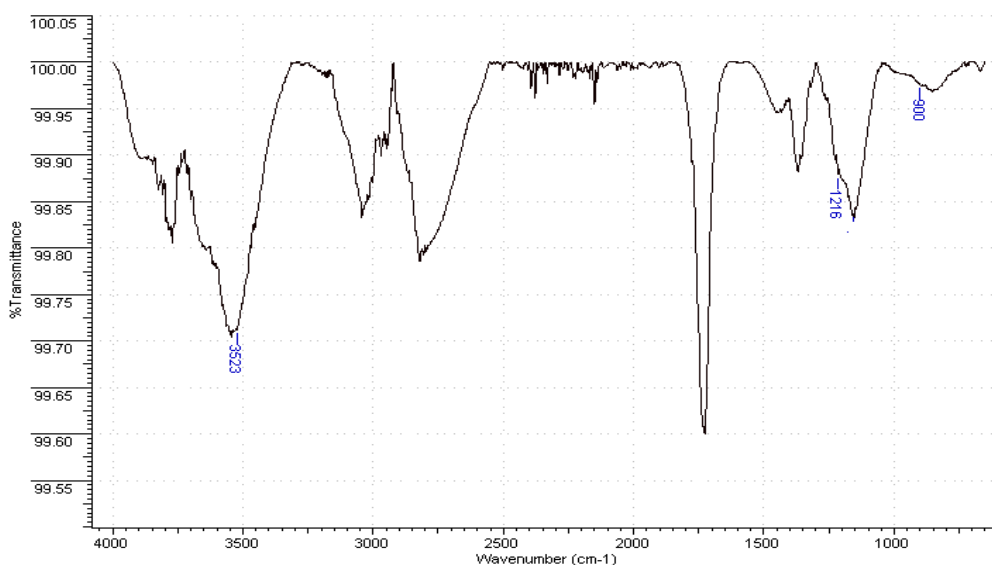
<sup>a</sup> Calculado teniendo en cuenta la mezcla de reacción y el rendimiento de la polimerización.

<sup>b</sup> Titración con bromuro de tetraetil amonio y ácido perclórico en presencia de cristal violeta.

<sup>d</sup> En estos casos no se realizó el cálculo del grado de epoxidación por análisis elemental debido a que tanto los monómeros como los crosslinker poseían hetero átomos.

##### b) Caracterización de los grupos epóxido mediante espectroscopia de infrarrojo (ATR/FT-IR).

En la Figura 63 se muestra el espectro obtenido mediante ATR del polímero caracterizado. En el espectro se pueden observar las señales características de polímeros funcionalizados con grupos epóxido y grupos hidroxilo: una banda correspondiente al stretching -OH a  $3523\text{ cm}^{-1}$ , una banda a  $900\text{ cm}^{-1}$  característica de la absorción por grupos epóxido y una banda a  $1216\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la vibración del grupo epóxido ( banda de vibración C-O de un éter cíclico).



**Figura 63.** Espectro ATR del polímero poli(GMA-HEMA-co-EGDMA)-9.

## 2. Comportamiento térmico: Análisis termogravimétrico (TGA).

En la Figura 64, se puede observar el análisis termogravimétrico del polímero caracterizado presenta una excelente estabilidad térmica hasta los 150° C, más allá de esta temperatura el material comienza a descomponerse y su pérdida de peso se hace evidente. Se observan dos etapas principales de pérdida de peso, la primera, con un pequeño hombro, a 150°C, parece ser una combinación de dos descomposiciones, correspondientes a la liberación de grupos glicidiloxi, etanodiol y productos de polimerización metacrílica con menor grado de entrecruzamiento, y la segunda a una temperatura de 377°C, corresponde a la liberación de productos de polimerización metacrílica con mayor grado de entrecruzamiento.

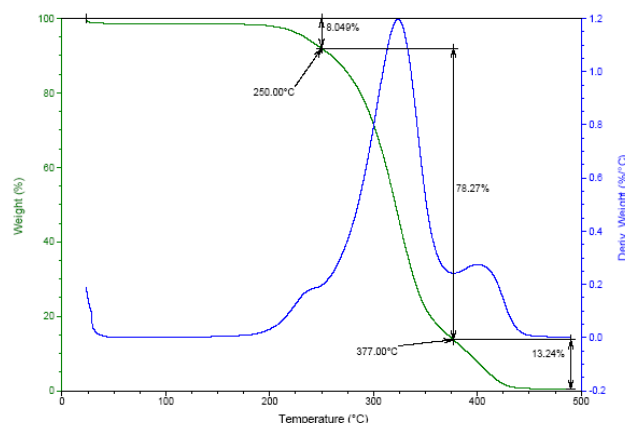


Figura 64. Análisis termogravimétrico del polímero poli(GMA-HEMA-co-EGDMA)-9.

## 3. Caracterización textural.

Con las técnicas de adsorción-desorción de nitrógeno (empleando el método BJH <sup>507, 508</sup>) y microscopía electrónica de barrido se determinaron las propiedades texturales de los polímeros sintetizados.

### a) Isotherma de adsorción-desorción de nitrógeno.

La isoterma de adsorción-desorción de nitrógeno de este polímero es de tipo IV según la clasificación BET, <sup>506</sup> anteriormente mencionada, en la que se observa un ciclo de histéresis perteneciente al tipo H1, que se ha descrito en morfologías que tienen distribuciones de poro muy angostas o aglomerados de partículas esféricas de tamaños y distribuciones aproximadamente uniformes (Figura 65).

Las ramas de adsorción y desorción de la isoterma son paralelas y llegan a unirse aproximadamente en el punto donde comienza la zona intermedia lineal (P/Po: 0.74 → Radio de poro mesoporoso: 32.6 nm), presentando un pequeño ciclo de histéresis. Estos fenómenos de histéresis que aparecen en la zona de desorción de la multicapa están asociados a la condensación capilar en estructuras mesoporosas.



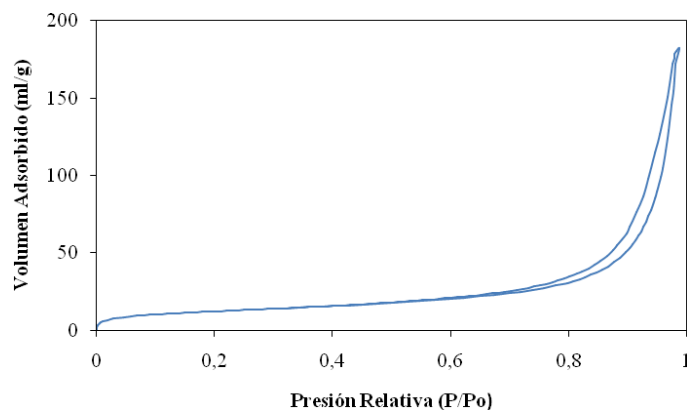


Figura 65. Isoterma de adsorción de nitrógeno del polímero poli(GMA-HEMA-co-EGDMA)-9.

**b) Distribución de poro.**

En la Figura 66 se presenta la distribución de poro y en la Tabla 52 se representa la distribución del volumen de poro de este polímero. Como se puede observar este polímero es mayoritariamente mesoporoso, y los mesoporos de gran tamaño contribuyen significativamente al volumen de poro de soporte.

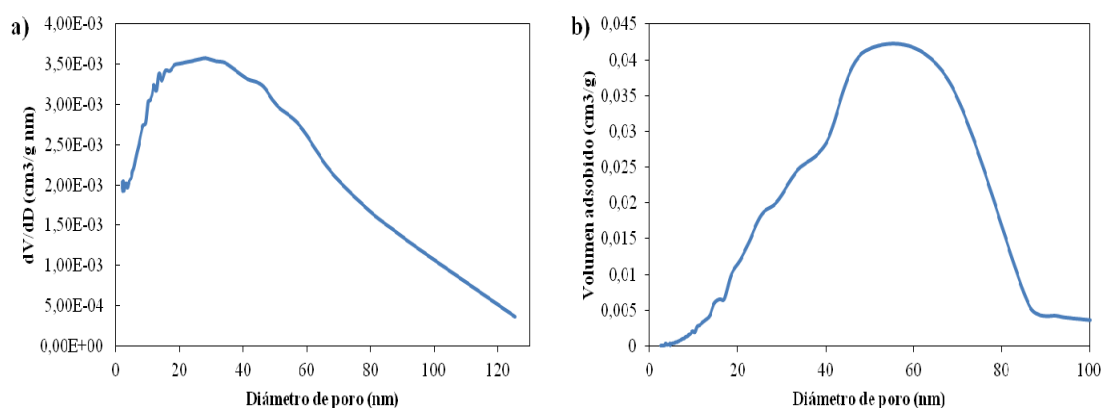


Figura 66. Distribución de poro determinado a partir de los datos de adsorción empleando el método BJH.<sup>507,508</sup> a) Distribución del tamaño de poro. b) Distribución del volumen de poro.

Tabla 52. Distribución del volumen de poro agrupando los poros por grupos de tamaño.

Diámetro (nm)	< 5	5-10	10-15	15-20	20-30	30-50	50-100	>100
Distribución del volumen de poro (%vol.)	2,47	4,44	6,14	7,07	10,49	21,60	41,64	6,15

**c) Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).**

En la Figura 67 se muestran las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido del polímero poli(GMA-HEMA-co-EGDMA)-9. La morfología encontrada es típica de agregados de partículas, con poros interconectados formados en el espacio interparticular.

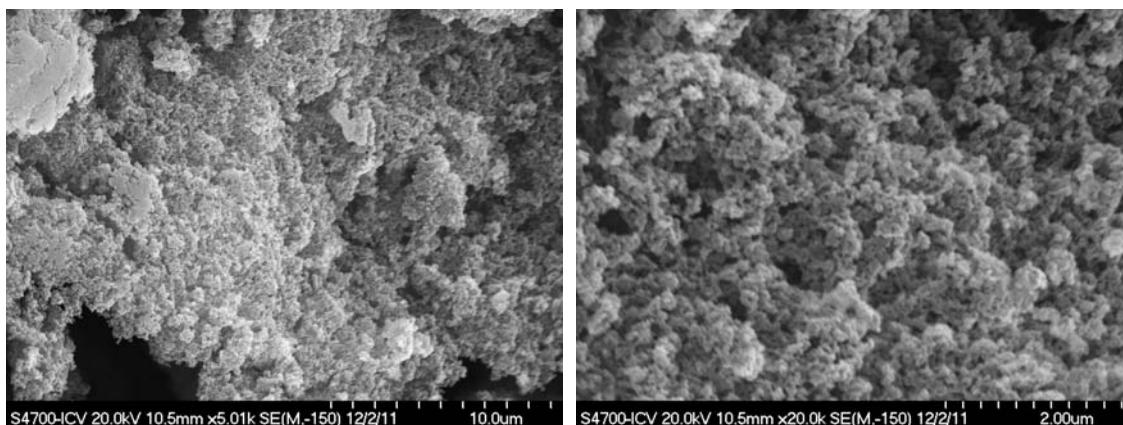
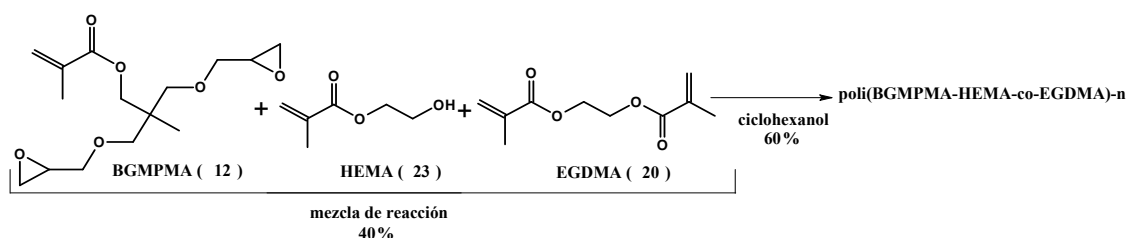


Figura 67. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido.

### 5.3.3.2.2.A. Síntesis, superficie específica y porosidad de {{2,2-bis [(glicidilo) metil]} propil} metacrilato (BGMPMA) (12) y HEMA (23) con EGDMA (20): poli(BGMPMA-HEMA-co-EGDMA)-n.

Siguiendo con el criterio establecido de emplear una mezcla de monómeros para aumentar la hidrofiliidad, pasamos a las polimerizaciones con el monómero BGMPMA (12) (Esquema 53).



Esquema 53. Síntesis de poli(BGMPMA-HEMA-co-EGDMA)-n.

Se mantienen las mismas condiciones de reacción que en el caso anterior, pero esta vez empleando como monómeros BGMPMA (12) y HEMA (23). Los resultados obtenidos quedan reflejados en la Tabla 53.

Aunque los rendimientos mejoran ostensiblemente, en relación al grupo de polimerización poli(BGMPMA-co-EGDMA), en la mayoría de los casos se han obtenido polímeros no porosos. Únicamente, empleando una mezcla de reacción 60% de monómeros y 30% de crosslinker, a 50°C, se obtienen polímeros porosos con una baja superficie específica

De estos polímeros, el que presenta mejores propiedades texturales es la entrada  $n=2$ , por lo que es el elegido para llevar a cabo las pruebas de inmovilización de enzimas. A continuación se expone un estudio de reproducibilidad del método de polimerización y una caracterización más detallada de este polímero.

**Tabla 53.** Síntesis y propiedades texturales de poli(BGMPMA-HEMA-co-EGDMA)-n (n= 1-12).

Entrada (n)	Mezcla de reacción			% Iniciador	T <sup>a</sup> (°C)	Rto. (%)	Volumen de poro (cm <sup>3</sup> /g)	Tamaño de poro (nm)	Superficie BET (m <sup>2</sup> /g)	R
	% BGMPMA (12)	% monómero (HEMA)	% crosslinker (EGDMA)							
1	30	30	40	1% AIBN	50	96,5	0,11	22,3	21,3	1,05
2	30	30	40	5% AIBN	50	98,3	0,13	24,9	21,5	1,16
3	30	30	40	10% AIBN	50	99,0	0,04	30,0	5,2	5,77
4	30	30	40	1% AIBN	70	> 99	-	-	-	-
5	30	30	40	5% AIBN	70	> 99	-	-	-	-
6	30	30	40	10% AIBN	70	> 99	-	-	-	-
7	35	35	30	1% AIBN	50	> 99	-	-	-	-
8	35	35	30	5% AIBN	50	> 99	-	-	-	-
9	35	35	30	10% AIBN	50	> 99	-	-	-	-
10	35	35	30	1% AIBN	70	> 99	-	-	-	-
11	35	35	30	5% AIBN	70	> 99	-	-	-	-
12	35	35	30	10% AIBN	70	> 99	-	-	-	-

%: Expresa el porcentaje en peso.

Rto.: Rendimiento de la polimerización.

R: Relación de tamaño de poro /superficie específica.

-: Polímeros con una superficie menor a 1 m<sup>2</sup>/g.

#### • Estudio de reproducibilidad del método de polimerización.

El estudio de reproducibilidad se llevó a cabo realizando 5 polimerizaciones en días diferentes, bajo las mismas condiciones, obteniéndose una elevada reproducibilidad del método de polimerización. En la Tabla 54 se muestran los resultados obtenidos en este estudio.

**Tabla 54.** Resultados obtenidos en el estudio de reproducibilidad de la técnica de polimerización.

Polimerización	Rto. (%)	Volumen de poro (cm <sup>3</sup> /g)	Tamaño de poro (nm)	Superficie BET (m <sup>2</sup> /g)
1 <sup>a</sup>	98,3	0,13	24,9	21,5
2 <sup>a</sup>	99,0	0,15	21,5	28,9
3 <sup>a</sup>	92,1	0,17	26,7	20,9
4 <sup>a</sup>	96,4	0,11	23,2	26,5
5 <sup>a</sup>	97,3	0,18	22,6	27,6
Desviación estándar	2,4	0,03	1,8	3,3

Rto.: Rendimiento de la polimerización.

%: Representa el porcentaje en peso.

#### 5.3.3.2.2.B. Caracterización de poli(BGMPMA-HEMA-co-EGDMA)-2.

##### 1. Análisis y caracterización de grupos epóxido.

##### a) Determinación del grado de epoxidación del polímero.

Como se observa en la Tabla 55, el resultado de la valoración de los grupos epóxido concuerda con el margen teórico obtenido teniendo en cuenta la mezcla y el rendimiento de la polimerización.

**Tabla 55.** Grado de epoxidación de poli(BGMPMA-*co*-EGDMA)-n.

Polímero	Grado de epoxidación (mmol epóxido/g de polímero)		
	Teórico <sup>a</sup>	Análisis elemental	Valoración <sup>b</sup>
<b>Poli(BGMPMA-HEMA-<i>co</i>-EGDMA)-2</b>	2.00-1.90	---- <sup>d</sup>	1.90

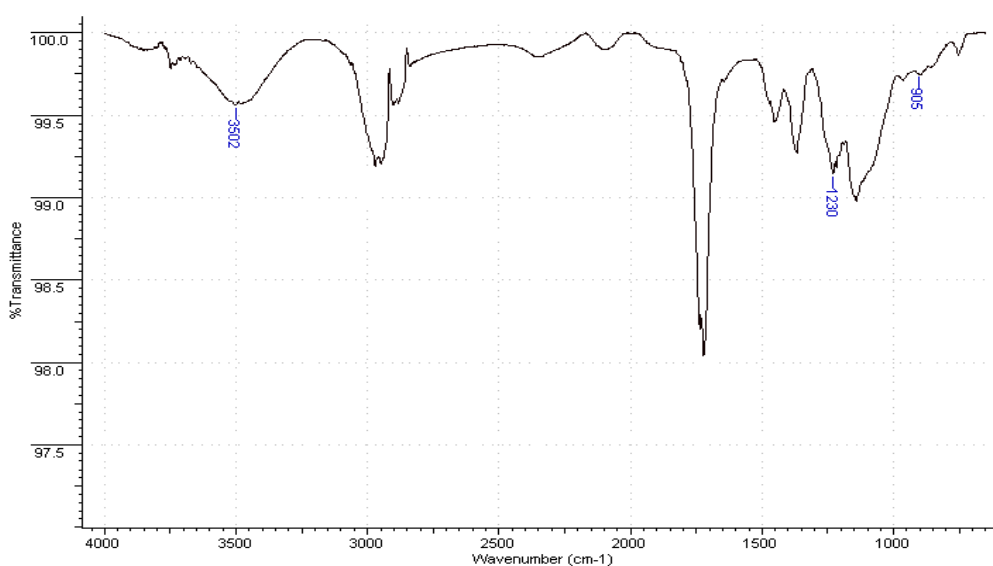
<sup>a</sup> Calculado teniendo en cuenta la mezcla de reacción y el rendimiento de la polimerización.

<sup>b</sup> Tritiación con bromuro de tetraetil amonio y ácido perclórico en presencia de cristal violeta.

<sup>d</sup> En estos casos no se realizó el cálculo del grado de epoxidación por análisis elemental debido a que tanto los monómeros como los crosslinker poseían heteroátomos.

### b) Caracterización de los grupos epóxido mediante espectroscopia de infrarrojo (ATR/FT-IR).

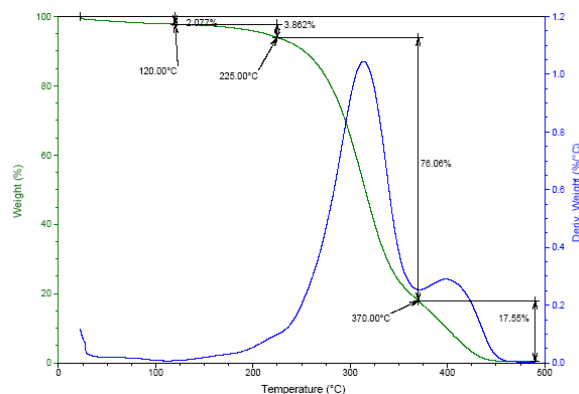
En la Figura 68 se muestra el espectro obtenido mediante ATR del polímero caracterizado. En el espectro se pueden observar las señales características de polímeros funcionalizados con grupos epóxido y grupos hidroxilo: una banda correspondiente al stretching -OH a 3502 cm<sup>-1</sup>, una banda a 905 cm<sup>-1</sup> característica de la absorción por grupos epóxido y una banda a 1230 cm<sup>-1</sup> correspondiente a la vibración del grupo epóxido ( banda de vibración C-O de un éter cíclico).

**Figura 68.** Espectro ATR del polímero poli(BGMPMA-HEMA-*co*-EGDMA)-2.

### 2. Comportamiento térmico: Análisis termogravimétrico (TGA).

En la Figura 69, se puede observar que el polímero caracterizado presenta una excelente estabilidad térmica hasta los 120° C, más allá de esta temperatura el material comienza a descomponerse y su pérdida de peso se hace evidente. Se observan dos etapas principales de pérdida de peso, la primera, con un pequeño hombro, a 120°C, parece ser una combinación de dos descomposiciones, correspondientes a la liberación de grupos 2,2-bis [(glicidiloxi) metil] propiloxi, etanodiol y productos de polimerización metacrílica con menor grado de

entrecruzamiento, y la segunda a una temperatura de 370°C, corresponde a la liberación de productos de polimerización metacrílica con mayor grado de entrecruzamiento.



**Figura 69.** Análisis termogravimétrico del polímero poli(BGMPMA-HEMA-co-EGDMA)-2.

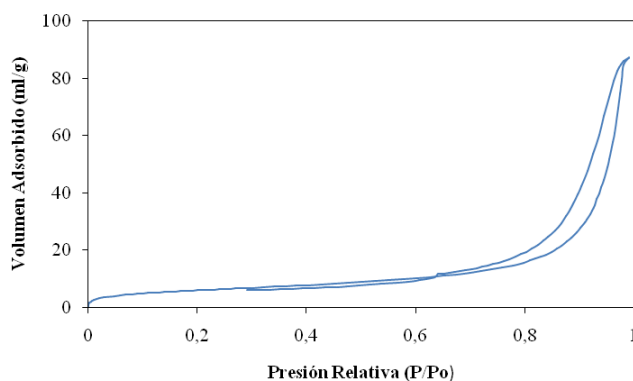
### 3. Caracterización textural.

Con las técnicas de adsorción-desorción de nitrógeno (empleando el método BJH <sup>507, 508</sup>) y microscopía electrónica de barrido se determinaron las propiedades texturales de los polímeros sintetizados.

#### a) Isotherma de adsorción-desorción de nitrógeno.

La isoterma de adsorción-desorción de nitrógeno de este polímero es de tipo IV según la clasificación BET, <sup>506</sup> anteriormente mencionada, en la que se observa un ciclo de histéresis perteneciente al tipo H1, que se ha descrito en morfologías que tienen distribuciones de poro muy angostas o aglomerados de partículas esféricas de tamaños y distribuciones aproximadamente uniformes (Figura 70).

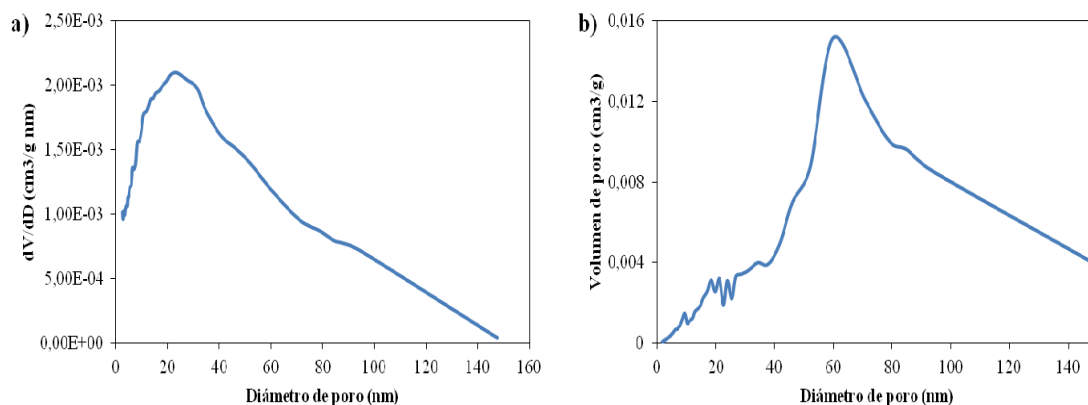
Las ramas de adsorción y desorción de la isoterma son paralelas y llegan a unirse aproximadamente en el punto donde comienza la zona intermedia lineal ( $P/P_0$ : 0.64  $\rightarrow$  Radio de poro mesoporoso: 22.2 nm), presentando un pequeño ciclo de histéresis. Estos fenómenos de histéresis que aparecen en la zona de desorción de la multicapa están asociados a la condensación capilar en estructuras mesoporosas.



**Figura 70.** Isotherma de adsorción de nitrógeno del polímero poli(BGMPMA-HEMA-co-EGDMA)-2.

### b) Distribución de poro.

En la Figura 71 se presenta la distribución de poro y en la Tabla 56 se representa la distribución del volumen de poro de este polímero. Como se puede observar este polímero es mayoritariamente mesoporoso y los mesoporos de gran tamaño contribuyen de forma significativa al volumen de poro del soporte.



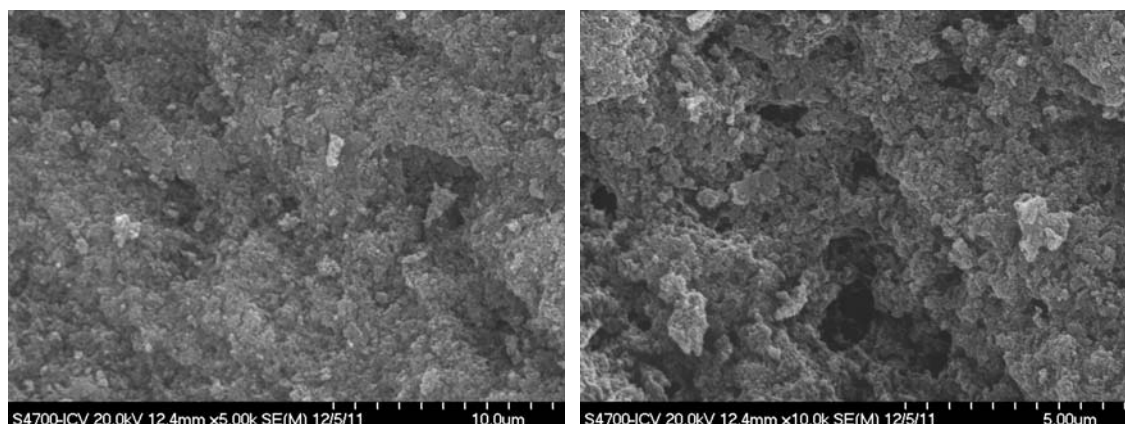
**Figura 71.** Distribución de poro determinado a partir de los datos de adsorción empleando el método BJH.<sup>507, 508</sup> a) Distribución del tamaño de poro. b) Distribución del volumen de poro.

**Tabla 56.** Distribución del volumen de poro agrupando los poros por grupos de tamaño.

Diámetro (nm)	< 5	5-10	10-15	15-20	20-30	30-50	50-100	>100
<b>Distribución del volumen de poro (%vol.)</b>	2,68	5,10	7,19	7,97	13,03	25,90	35,04	3,09

### c) Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

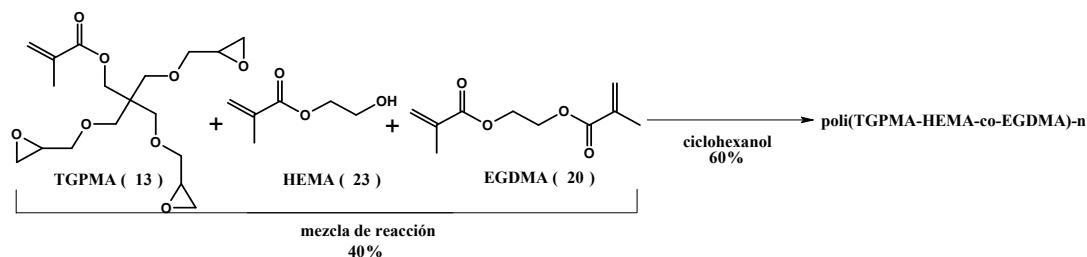
En la Figura 72 se muestran las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido del polímero poli(BGMPMA-HEMA-co-EGDMA)-2. La morfología encontrada es típica de agregados de partículas, con poros interconectados formados en el espacio interparticular.



**Figura 72.** Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido.

### 5.3.3.2.3.A. Síntesis, superficie específica y porosidad de triglicidil pentaeritritil metacrilato (TGPMA) (13) y HEMA (23) con EGDMA (20): poli(TGPMA-HEMA-co-EGDMA)-n.

Finalmente se lleva a cabo la polimerización de la mezcla de monómeros, con el metacriloxirano de tres grupos epóxidos (TGPMA) (13) y HEMA (23) (Esquema 54). Los resultados obtenidos en esta polimerización están reflejados en la Tabla 57.



Esquema 54. Síntesis de poli(TGPMA-HEMA-co-EGDMA)-n.

Prácticamente, se obtienen los mismos resultados que en el grupo anterior, es decir, se mejoran los rendimientos de reacción respecto a los poli(TGPMA-co-EGDMA), pero las propiedades texturales empeoran, sobre todo a 70°C, donde no se logran obtener polímeros porosos. Únicamente, se logran obtener polímeros con unas propiedades texturales aceptables, empleando un porcentaje de mezcla de monómeros de 60% a 50°C y un porcentaje de AIBN (1%-5%).

Tabla 57. Síntesis y propiedades texturales de poli(TGPMA-HEMA-co-EGDMA)-n (n= 1-12).

Entrada (n)	Mezcla de reacción			% Iniciador	T <sup>a</sup> (°C)	Rto. (%)	Volumen de poro (cm <sup>3</sup> /g)	Tamaño de poro (nm)	Superficie BET (m <sup>2</sup> /g)	R
	% TGPMA (13)	% monómero (HEMA)	% crosslinker (EGDMA)							
1	30	30	40	1% AIBN	50	86,0	0,20	24,8	33,1	0,75
2	30	30	40	5% AIBN	50	95,1	0,18	22,7	33,0	0,69
3	30	30	40	10% AIBN	50	97,5	0,09	25,6	14,2	1,80
4	30	30	40	1% AIBN	70	97,8	0,01	32,2	1,9	16,95
5	30	30	40	5% AIBN	70	> 99	-	-	-	-
6	30	30	40	10% AIBN	70	> 99	-	-	-	-
7	35	35	30	1% AIBN	50	> 99	-	-	-	-
8	35	35	30	5% AIBN	50	> 99	-	-	-	-
9	35	35	30	10% AIBN	50	> 99	-	-	-	-
10	35	35	30	1% AIBN	70	> 99	-	-	-	-
11	35	35	30	5% AIBN	70	> 99	-	-	-	-
12	35	35	30	10% AIBN	70	> 99	-	-	-	-

%: Expresa el porcentaje en peso.

Rto.: Rendimiento de la polimerización.

R: Relación de tamaño de poro /superficie específica.

-: Polímeros con una superficie menor a 1 m<sup>2</sup>/g.

De estos polímeros, el que presenta mejores propiedades texturales es la entrada n= 1, por lo que es el elegido para llevar a cabo las pruebas de inmovilización de enzimas. A

continuación se expone un estudio de reproducibilidad del método de polimerización y una caracterización más detallada de este polímero.

- **Estudio de reproducibilidad del método de polimerización.**

El estudio de reproducibilidad se llevó a cabo realizando 5 polimerizaciones en días diferentes, bajo las mismas condiciones, obteniéndose una elevada reproducibilidad del método de polimerización. En la Tabla 58 se muestran los resultados obtenidos en este estudio.

**Tabla 58.** Resultados obtenidos en el estudio de reproducibilidad del método de polimerización.

Polimerización	Rto. (%)	Volumen de poro (cm <sup>3</sup> /g)	Tamaño de poro (nm)	Superficie BET (m <sup>2</sup> /g)
1 <sup>a</sup>	86,0	0,20	24,8	33,1
2 <sup>a</sup>	87,3	0,19	23,7	39,6
3 <sup>a</sup>	86,9	0,17	26,2	30,8
4 <sup>a</sup>	88,1	0,23	25,1	31,5
5 <sup>a</sup>	85,4	0,25	25,3	32,9
<b>Desviación estándar</b>	1,0	0,03	0,8	3,1

Rto.: Rendimiento de la polimerización.

%: Representa el porcentaje en peso.

### 5.3.3.2.3.B. Caracterización de poli(TGPMA-HEMA-co-EGDMA)-1.

#### 1. Análisis y caracterización de los grupos epóxido.

##### a) Determinación del grado de epoxidación del polímero.

Como se observa en la Tabla 59, el resultado de la valoración de los grupos epóxido concuerda con el margen teórico obtenido teniendo en cuenta la mezcla y el rendimiento de la polimerización.

**Tabla 59.** Grado de epoxidación de poli(TGPMA-HEMA-co-EGDMA)-1.

Polímero	Grado de epoxidación (mmol epóxido/g de polímero)		
	Teórico <sup>a</sup>	Análisis elemental	Valoración <sup>b</sup>
<b>Poli(TGPMA-HEMA-co-EGDMA)-1</b>	2.80-1.50	---- <sup>d</sup>	1.60

<sup>a</sup> Calculado teniendo en cuenta la mezcla de reacción y el rendimiento de la polimerización.

<sup>b</sup> Titración con bromuro de tetraetil amonio y ácido perclórico en presencia de cristal violeta.

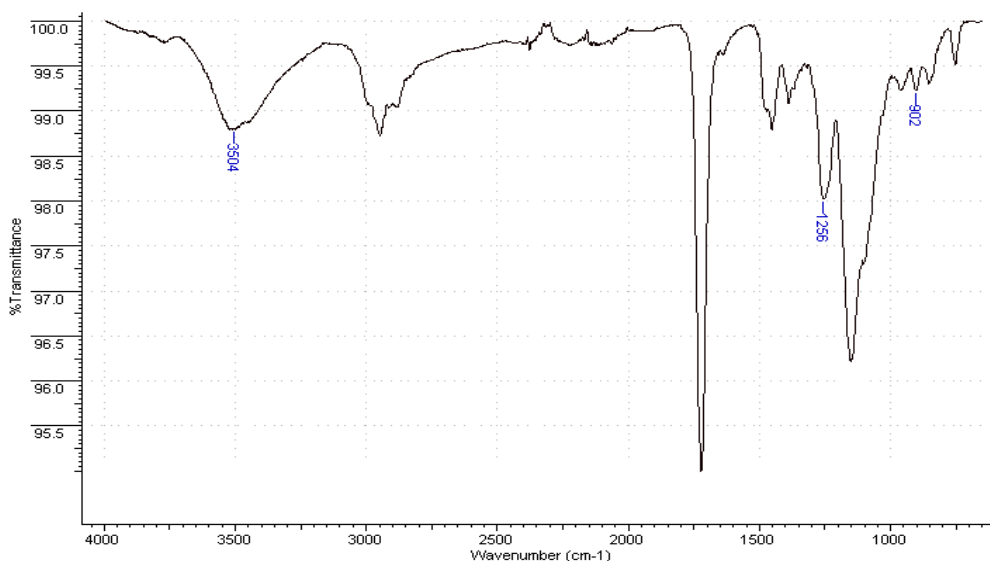
<sup>d</sup> En estos casos no se realizó el cálculo del grado de epoxidación por análisis elemental debido a que tanto los monómeros como los crosslinker poseían heteroátomos.

##### b) Caracterización de los grupos epóxido mediante espectroscopia de infrarrojo (ATR/FT-IR).

En la Figura 73 se muestra el espectro obtenido mediante ATR del polímero caracterizado. En el espectro se pueden observar las señales características de polímeros funcionalizados con grupos epóxido y grupos hidroxilo: una banda correspondiente al



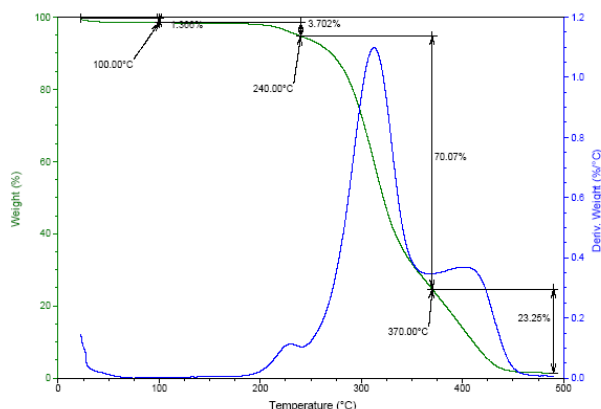
stretching  $-OH$  a  $3504\text{ cm}^{-1}$ , una banda a  $902\text{ cm}^{-1}$  característica de la absorción por grupos epóxido y una banda a  $1256\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la vibración del grupo epóxido (banda de vibración C-O-C de un éter cíclico).



**Figura 73.** Espectro ATR del polímero poli(TGPMA-HEMA-co-EGDMA)-1.

## 2. Comportamiento térmico: Análisis termogravimétrico (TGA).

En la Figura 74, se puede observar el análisis termogravimétrico del polímero caracterizado presenta una excelente estabilidad térmica hasta los  $180^{\circ}\text{C}$ , más allá de esta temperatura el material comienza a descomponerse y su pérdida de peso se hace evidente.



**Figura 74.** Análisis termogravimétrico del polímero poli(TGPMA-HEMA-co-EGDMA)-1.

En esta Figura se observan dos etapas principales de pérdida de peso, la primera, con un pequeño hombro, a  $180^{\circ}\text{C}$ , parece ser una combinación de dos descomposiciones, correspondientes a la liberación de grupos triglicidil pentaeritritoxi, etanodiol y productos de polimerización metacrílica con menor grado de entrecruzamiento, y la segunda a una temperatura de  $370^{\circ}\text{C}$ , corresponde a la liberación de productos de polimerización metacrílica con mayor grado de entrecruzamiento.

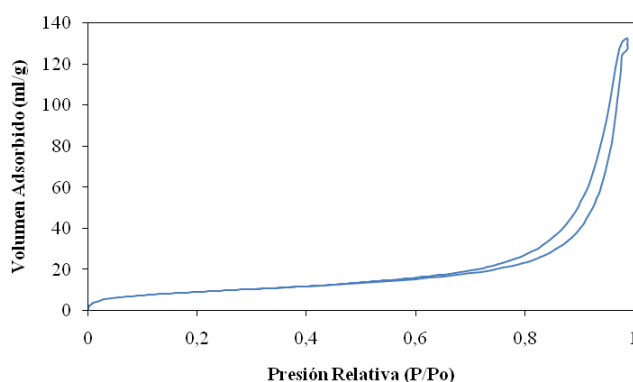
### 3. Caracterización textural.

Con las técnicas de adsorción-desorción de nitrógeno (empleando el método BJH <sup>507, 508</sup>) y microscopía electrónica de barrido se determinaron las propiedades texturales de los polímeros sintetizados.

#### a) Isotherma de adsorción-desorción de nitrógeno.

La isoterma de adsorción-desorción de nitrógeno de este polímero es de tipo IV según la clasificación BET, <sup>506</sup> anteriormente mencionada, en la que se observa un ciclo de histéresis perteneciente al tipo H1, que se ha descrito en morfologías que tienen distribuciones de poro muy angostas o aglomerados de partículas esféricas de tamaños y distribuciones aproximadamente uniformes (Figura 75).

Las ramas de adsorción y desorción de la isoterma son paralelas y llegan a unirse aproximadamente en el punto donde comienza la zona intermedia lineal ( $P/P_0$ : 0.70  $\rightarrow$  Radio de poro mesoporoso: 27.6 nm), presentando un pequeño ciclo de histéresis. Estos fenómenos de histéresis que aparecen en la zona de desorción de la multicapa están asociados a la condensación capilar en estructuras mesoporosas.



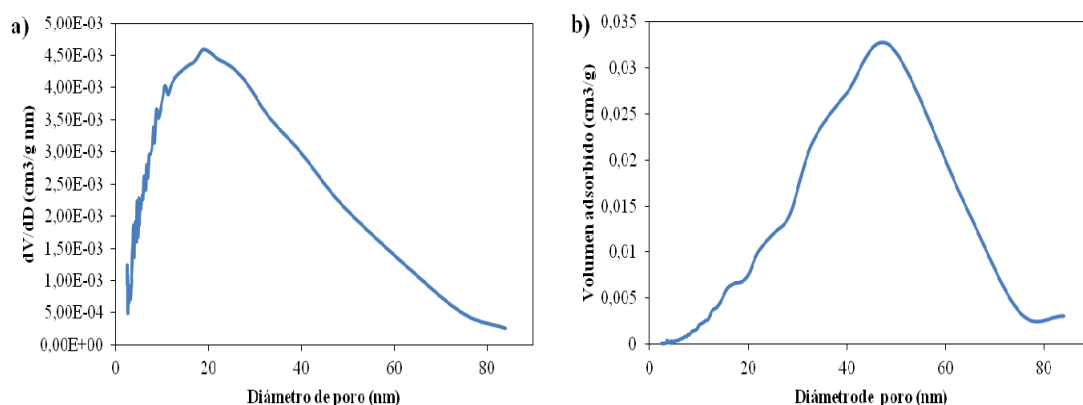
**Figura 75.** Isotherma de adsorción de nitrógeno del polímero poli(TGPMA-HEMA-co-EGDMA)-1.

#### b) Distribución de poro.

En la Figura 76 se presenta la distribución de poro y en la Tabla 60 se representa la distribución del volumen de poro de este polímero. Como se puede observar este polímero es fundamentalmente mesoporoso y los poros mesoporosos de gran tamaño contribuyen significativamente al volumen de poro del soporte.

**Tabla 60.** Distribución del volumen de poro agrupando los poros por grupos de tamaño.

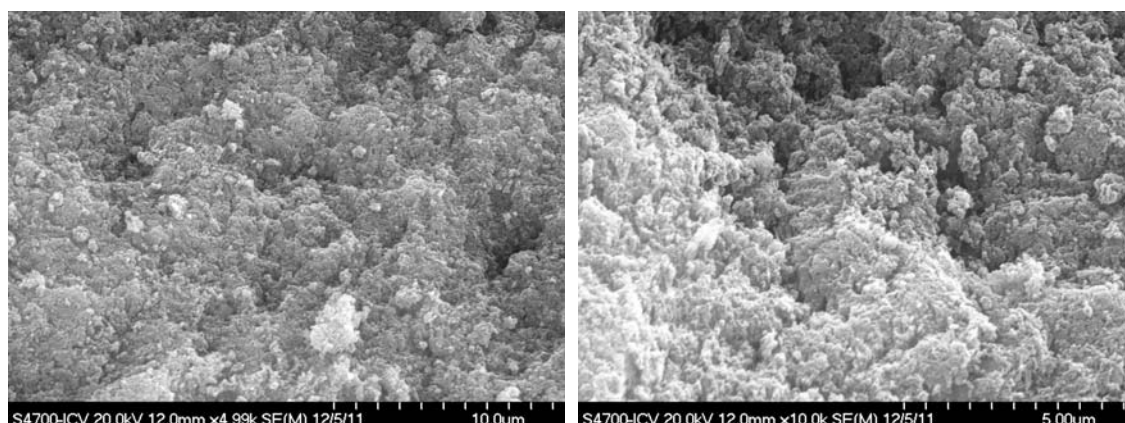
Diámetro (nm)	< 5	5-10	10-15	15-20	20-30	30-50	50-100	>100
Distribución del volumen de poro (%vol.)	2,78	4,65	6,60	7,33	14,58	25,23	32,99	5,83



**Figura 76.** Distribución de poro determinado a partir de los datos de adsorción empleando el método BJH.<sup>507, 508</sup> a) Distribución del tamaño de poro. b) Distribución del volumen de poro.

### c) Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

En la Figura 77 se muestran las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido del polímero poli(TGPMA-HEMA-*co*-EGDMA)-1. La morfología encontrada es típica de agregados de partículas, con poros interconectados formados en el espacio interparticular.



**Figura 77.** Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido.

#### 5.3.3.2.4. Resumen comparativo de las polimerizaciones de metacriloxiranos y monómero metacrílico con un grupo hidroxilo, con agente de entrecruzamiento metacrílico.

- El monómero que origina los polímeros con mejores propiedades texturales es el glicidil metacrilato (GMA) (**8**) a continuación el triglicidil pentaeritritil metacrilato (**13**), y por último el {{2,2-bis [(glicidiloxi) metil]} propil} metacrilato (**12**).
- Los porcentajes relativos de monómero y agente de entrecruzamiento que dan lugar a los mejores resultados varían con el empleo de los distintos monómeros. Es de 60/40 para los monómeros con 2 y 3 grupos oxiranos y de 70/30 para el monómero de un grupo oxirano.
- El mejor porcentaje de iniciador radicalario varían de 1 a 10% con el empleo de los distintos monómeros.

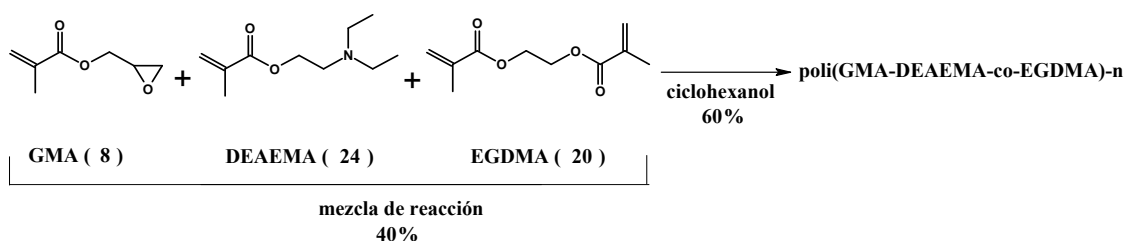
- d) La temperatura de polimerización ideal es de 50°C para los tres monómeros.
- e) El rendimiento obtenido este grupo de polimerizaciones es muy similar en todos los casos.

### 5.3.4.3. Síntesis, superficie específica y porosidad de metacriloxiranos y monómero metacrílico con un grupo amino con agente de entrecruzamiento metacrílico.

En este grupo de polimerización se ha incluido un monómero funcionalizado con grupos amino, el N,N-dietil aminoetil metacrilato (DEAEMA) (24), con el fin de aumentar el poder de intercambio aniónico del polímero, que favorece y acelera la absorción física de las enzimas al soporte,<sup>388,389</sup> y observar cómo afecta en las propiedades texturales de los polímeros.

El monómero DEAEMA (24) ha sido previamente empleado por otros grupos de investigación en la síntesis de diferentes polímeros con diferentes aplicaciones, como son: la inmovilización de enzimas,<sup>401, 524</sup> y la modulación de la actividad enzimática de ciertas enzimas.<sup>525,526</sup>

#### 5.3.4.3.1.A. Síntesis, superficie específica y porosidad de GMA (8) y 2-(dimetil amino) etil metacrilato (DEAEMA) (24) con EGDMA (20): poli(GMA-DEAEMA-co-EGDMA).



**Esquema 55.** Síntesis de poli(GMA-DEAEMA-co-EGDMA)-n.

Siguiendo con la metodología propuesta en las polimerizaciones anteriores con mezclas de monómeros, se realizaron las siguientes polimerizaciones, empleando esta vez un monómero metacrílico funcionalizado con un grupo amino terciario, el 2-(dimetil amino) etil metacrilato (DEAEMA) (24) (Esquema 55). Todos los resultados obtenidos quedan reflejados en la Tabla 61.

Analizando los resultados obtenidos en estas polimerizaciones, se observa como en los casos anteriores, que los mejores resultados se obtienen con la mezcla de reacción con un 60% de monómeros a 50°C y con porcentajes de AIBN (15-5%).

**Tabla 61.** Síntesis y propiedades texturales de poli(GMA-DEAEMA-co-EGDMA)-n (n= 1-12).

Entrada (n)	Mezcla de reacción			% Iniciador	T <sup>a</sup> (°C)	Rto. (%)	Volumen de poro (cm <sup>3</sup> /g)	Tamaño de poro (nm)	Superficie BET (m <sup>2</sup> /g)	R
	% GMA	% DEAEMA	% crosslinker (EGDMA)							
1	30	30	40	1% AIBN	50	84	0,29	31,4	37,8	0,83
2	30	30	40	5% AIBN	50	90	0,40	26,9	62,2	0,43
3	30	30	40	10% AIBN	50	96	0,23	18,6	49,5	0,38
4	30	30	40	1% AIBN	70	>99	0,02	21,3	3,2	6,66
5	30	30	40	5% AIBN	70	96	0,01	23,1	2,3	10,04
6	30	30	40	10% AIBN	70	>99	-	-	-	-
7	35	35	30	1% AIBN	50	76	0,02	39,9	2,4	16,63
8	35	35	30	5% AIBN	50	95	-	-	-	-
9	35	35	30	10% AIBN	50	98	-	-	-	-
10	35	35	30	1% AIBN	70	97	-	-	-	-
11	35	35	30	5% AIBN	70	>99	-	-	-	-
12	35	35	30	10% AIBN	70	96	-	-	-	-

% Expresa el porcentaje en peso.

Rto.: Rendimiento de la polimerización.

R: Relación tamaño de poro/superficie específica.

-: Polímeros con una superficie menor a 1 m<sup>2</sup>/g.

De estos polímeros, el que presenta mejores propiedades texturales es la entrada n= 1, por lo que es el elegido para llevar a cabo las pruebas de inmovilización de enzimas. A continuación se expone un estudio de reproducibilidad de la técnica de polimerización y una caracterización más detallada de este polímero.

- **Estudio de reproducibilidad del método de polimerización.**

El estudio de reproducibilidad se llevó a cabo realizando 5 polimerizaciones en días diferentes, bajo las mismas condiciones, obteniéndose una elevada reproducibilidad del método de polimerización. En la Tabla 62 se muestran los resultados obtenidos en este estudio.

**Tabla 62.** Resultados obtenidos en el estudio de reproducibilidad de la técnica de polimerización.

Polimerización	Rto. (%)	Volumen de poro (cm <sup>3</sup> /g)	Tamaño de poro (nm)	Superficie BET (m <sup>2</sup> /g)
1 <sup>a</sup>	84,3	0,29	31,4	37,7
2 <sup>a</sup>	88,1	0,19	28,9	42,5
3 <sup>a</sup>	86,2	0,17	30,5	39,0
4 <sup>a</sup>	83,8	0,23	31,8	36,4
5 <sup>a</sup>	90,0	0,25	27,3	43,7
Desviación estándar	2,3	0,04	1,7	2,8

Rto.: Rendimiento de la polimerización.

%: Representa el porcentaje en peso.

### 5.3.4.3.1.B. Caracterización de poli(GMA-DEAEMA-*co*-EGDMA)-1.

#### 1. Análisis y caracterización de los grupos epóxido.

##### a) Determinación del grado de epoxidación del polímero.

Como se observa en la Tabla 63, el resultado de la valoración de los grupos epóxido concuerda con el margen teórico obtenido teniendo en cuenta la mezcla y el rendimiento de la polimerización.

**Tabla 63.** Grado de epoxidación de poli(GMA-DEAEMA-*co*-EGDMA)-1.

Polímero	Grado de epoxidación (mmol epóxido/g de polímero)		
	Teórico <sup>a</sup>	Análisis elemental	Valoración <sup>b</sup>
<b>Poli(GMA-DEAEMA-<i>co</i>-EGDMA)-1</b>	2.50-1.20	---- <sup>d</sup>	2.42

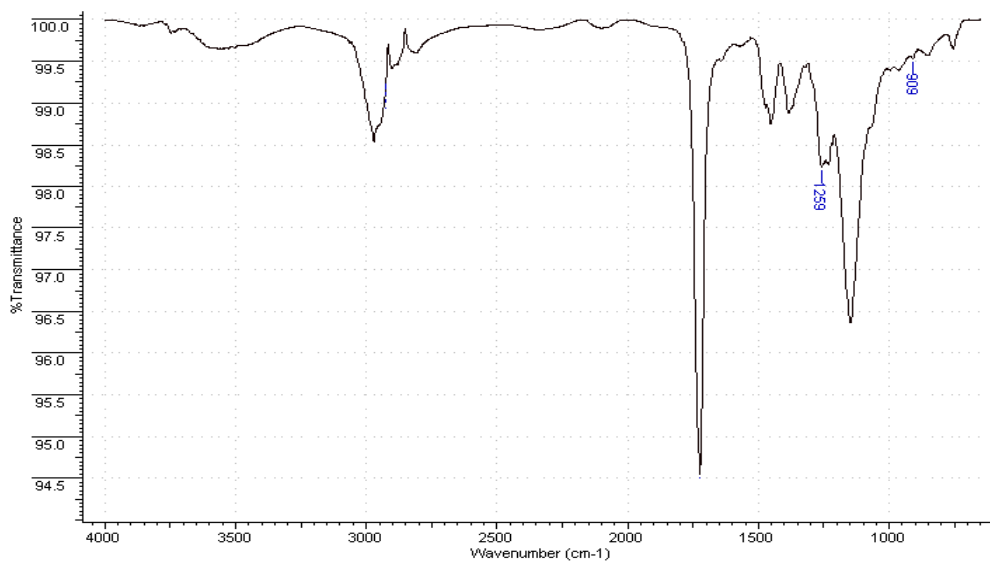
<sup>a</sup> Calculado teniendo en cuenta la mezcla de reacción y el rendimiento de la polimerización.

<sup>b</sup> Tritiación con bromuro de tetraetil amonio y ácido perclórico en presencia de cristal violeta.

<sup>d</sup> En estos casos no se realizó el cálculo del grado de epoxidación por análisis elemental debido a que tanto los monómeros como los crosslinker poseían heteroátomos.

##### b) Caracterización de los grupos epóxido mediante espectroscopia de infrarrojo (ATR/FT-IR).

En la Figura 78 se muestra el espectro obtenido mediante ATR del polímero caracterizado. En el espectro se pueden observar las señales características de polímeros funcionalizados con grupos epóxido: una banda a 909  $\text{cm}^{-1}$  característica de la absorción por grupos epóxido y una banda a 1259  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a la vibración del grupo epóxido (banda de vibración C-O de un éter cíclico).



**Figura 78.** Espectro ATR del polímero poli(GMA-DEAEMA-*co*-EGDMA)-1.

## 2. Comportamiento térmico: Análisis termogravimétrico (TGA).

En la Figura 79, se puede observar que el polímero caracterizado presenta una excelente estabilidad térmica hasta los 120°C, más allá de esta temperatura el material comienza a descomponerse y su pérdida de peso se hace evidente. Se observan dos etapas principales de pérdida de peso, la primera, con un pequeño hombro, a 120°C, parece ser una combinación de descomposiciones, correspondientes a la liberación de grupos glicidiloxi, dimetil aminoetanol y productos de polimerización metacrílica con bajo grado de entrecruzamiento, y la segunda, también con un pequeño hombro, a una temperatura de 356°C, corresponde a la liberación de productos de polimerización metacrílica con mayor grado de entrecruzamiento.

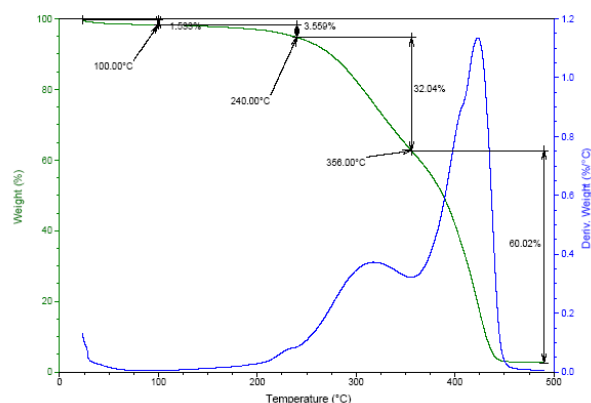


Figura 79. Análisis termogravimétrico del polímero poli(GMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1.

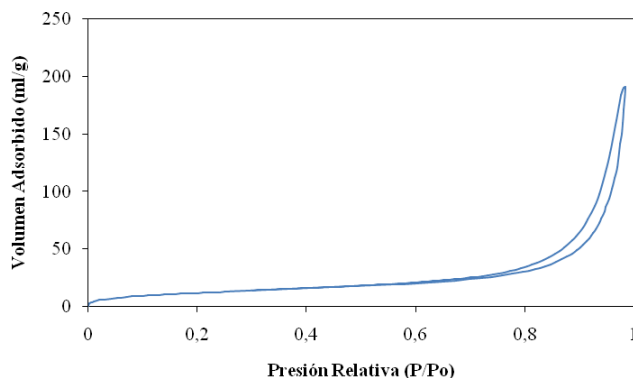
## 3. Caracterización textural.

Con las técnicas de adsorción-desorción de nitrógeno (empleando el método BJH <sup>507, 508</sup>) y microscopía electrónica de barrido se determinaron las propiedades texturales de los polímeros sintetizados.

### a) Isotherma de adsorción-desorción de nitrógeno.

La isoterma de adsorción-desorción de nitrógeno de este polímero es de tipo IV según la clasificación BET, <sup>506</sup> anteriormente mencionada, en la que se observa un ciclo de histéresis perteneciente al tipo H1, que se ha descrito en morfologías que tienen distribuciones de poro muy angostas o aglomerados de partículas esféricas de tamaños y distribuciones aproximadamente uniformes (Figura 80).

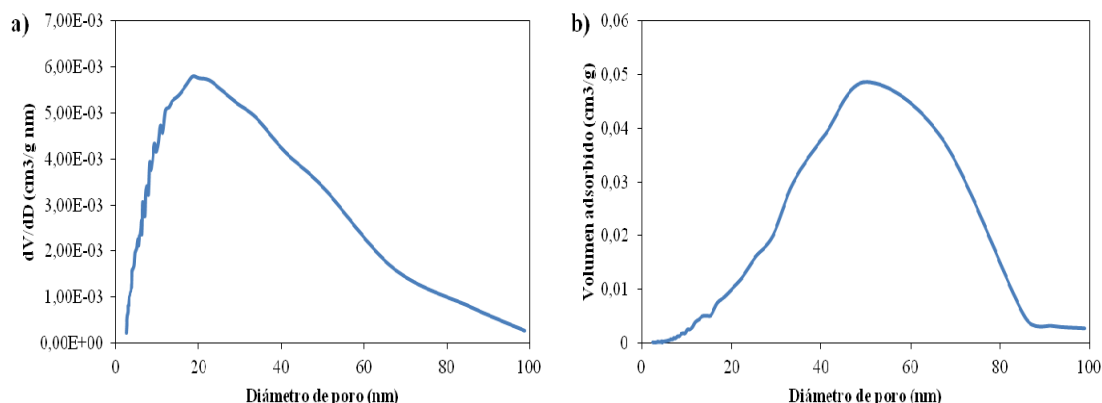
Las ramas de adsorción y desorción de la isoterma son paralelas y llegan a unirse aproximadamente en el punto donde comienza la zona intermedia lineal ( $P/P_0$ : 0.7 → Radio de poro mesoporoso: 27.6 nm), presentando un pequeño ciclo de histéresis. Estos fenómenos de histéresis que aparecen en la zona de desorción de la multicapa están asociados a la condensación capilar en estructuras meso porosas.



**Figura 80.** Isotherma de adsorción de nitrógeno del polímero poli(GMA-DEAEMA-*co*-EGDMA)-1.

### b) Distribución de poro.

En la Figura 81 se presenta la distribución de poro y en la Tabla 64 se representa la distribución del volumen de poro de este polímero. Como se puede observar este polímero es mayoritariamente mesoporoso y los mesoporos de gran tamaño contribuyen significativamente al volumen de poro del soporte.



**Figura 81.** Distribución de poro determinado a partir de los datos de adsorción empleando el método BJH.<sup>507, 508</sup> a) Distribución del tamaño de poro. b) Distribución del volumen de poro.

**Tabla 64.** Distribución del volumen de poro agrupando los poros por grupos de tamaño.

Diámetro (nm)	< 5	5-10	10-15	15-20	20-30	30-50	50-100	>100
<b>Distribución del volumen de poro (%vol.)</b>	3,00	3,97	5,76	6,16	9,02	22,50	38,68	11,22

### c) Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

En la Figura 82 se muestran las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido del polímero poli(GMA-DEAEMA-*co*-EGDMA)-1. La morfología encontrada es típica de agregados de partículas, con poros interconectados formados en el espacio interparticular.



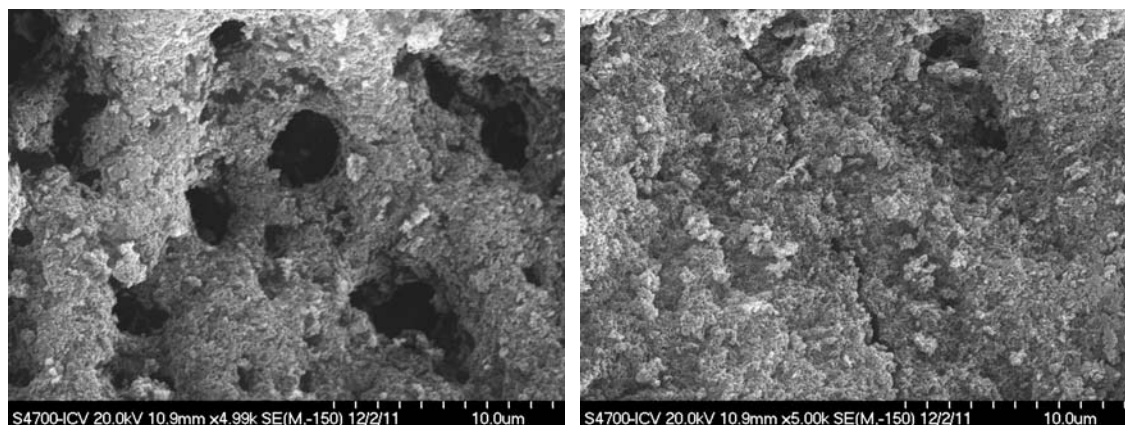
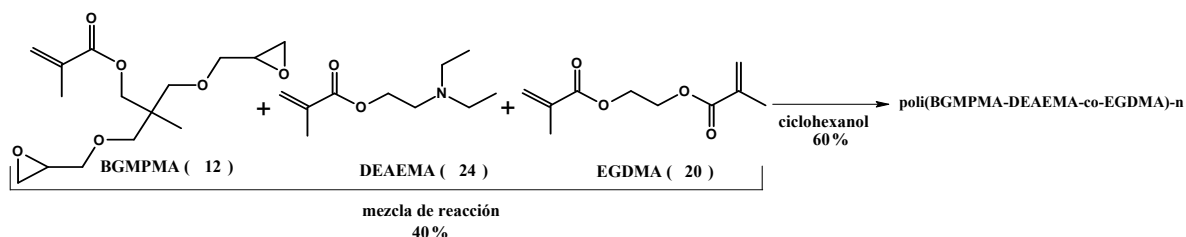


Figura 82. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido.

### 5.3.3.3.2.A. Síntesis, superficie específica y porosidad de {{2,2-bis [(glicidiloxi) metil]} propil} metacrilato (BGMPMA) (12) y DEAEMA (24) con EGDMA (20): poli(BGMPMA-DEAEMA-co-EGDMA).



Esquema 56. Síntesis de poli(BGMPMA-DEAEMA-co-EGDMA)-n.

Siguiendo con el criterio establecido para las polimerizaciones con mezclas de monómeros, se llevaron a cabo las polimerizaciones con el monómero metacrílico funcionalizado con dos grupos epóxidos BGMPMA (12) y DEAEMA (24) (esquema 56), cuyos resultados aparecen reflejados en la Tabla 65.

Tabla 65. Síntesis y propiedades texturales de poli(BGMPMA-DEAEMA-co-EGDMA)-n (n= 1-12).

Entrada (n)	Mezcla de reacción			% Iniciador	T <sup>a</sup> (°C)	Rto. (%)	Volumen de poro (cm <sup>3</sup> /g)	Tamaño de poro (nm)	Superficie BET (m <sup>2</sup> /g)	R
	% BGMPMA (12)	% DEAEMA (24)	% crosslinker (EGDMA)							
1	30	30	40	1% AIBN	50	94,2	0,09	21,9	17,2	1,17
2	30	30	40	5% AIBN	50	98,0	0,03	24,5	4,4	5,57
3	30	30	40	10% AIBN	50	> 99	-	-	-	-
4	30	30	40	1% AIBN	70	> 99	-	-	-	-
5	30	30	40	5% AIBN	70	> 99	-	-	-	-
6	30	30	40	10% AIBN	70	> 99	-	-	-	-
7	35	35	30	1% AIBN	50	> 99	-	-	-	-
8	35	35	30	5% AIBN	50	> 99	-	-	-	-
9	35	35	30	10% AIBN	50	> 99	-	-	-	-
10	35	35	30	1% AIBN	70	> 99	-	-	-	-
11	35	35	30	5% AIBN	70	> 99	-	-	-	-
12	35	35	30	10% AIBN	70	> 99	-	-	-	-

Rto.: Rendimiento de la polimerización. % Expresa el porcentaje en peso.

R: Relación tamaño de poro/superficie específica.

-: Polímeros con una superficie menor a 1 m<sup>2</sup>/g.

En este grupo de polimerización, se han obtenido polímeros con una superficie específica inferior a  $1\text{m}^2/\text{g}$  en la mayoría de las entradas. De estos datos no se pueden sacar unas conclusiones sobre la influencia de las variables en las propiedades físicas de los polímeros, excepto que la introducción de un monómero funcionalizado con un grupo amino empeora las propiedades texturales.

El polímero que presenta mejores propiedades texturales es la entrada n= 1, por lo que es el elegido para llevar a cabo las pruebas de inmovilización de enzimas. A continuación se expone un estudio de reproducibilidad de la técnica de polimerización y una caracterización más detallada de este polímero.

- **Estudio de reproducibilidad del método de polimerización.**

El estudio de reproducibilidad se llevó a cabo realizando 5 polimerizaciones en días diferentes, bajo las mismas condiciones, obteniéndose una elevada reproducibilidad del método de polimerización. En la Tabla 66 se muestran los resultados obtenidos en este estudio.

**Tabla 66.** Resultados obtenidos en el estudio de reproducibilidad de la técnica de polimerización.

Polimerización	Rto. (%)	Volumen de poro ( $\text{cm}^3/\text{g}$ )	Tamaño de poro (nm)	Superficie BET ( $\text{m}^2/\text{g}$ )
1 <sup>a</sup>	94,2	0,09	21,9	17,2
2 <sup>a</sup>	96,3	0,08	23,1	15,4
3 <sup>a</sup>	90,9	0,13	20,7	20,3
4 <sup>a</sup>	95,3	0,08	22,7	16,2
5 <sup>a</sup>	98,0	0,05	25	14,7
Desviación estándar	2,4	0,03	1,4	2,0

Rto.: Rendimiento de la polimerización.

%: Representa el porcentaje en peso.

### 5.3.3.3.2.B. Caracterización de poli(BGMPMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1.

#### 1. Análisis y caracterización de los grupos epóxido.

##### a) Determinación del grado de epoxidación del polímero.

Como se observa en la Tabla 67, el resultado de la valoración de los grupos epóxido concuerda con el margen teórico obtenido teniendo en cuenta la mezcla y el rendimiento de la polimerización.

**Tabla 67.** Grado de epoxidación de poli(BGMPMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1.

Polímero	Grado de epoxidación ( $\text{mmol epóxido/g de polímero}$ )		
	Teórico <sup>a</sup>	Análisis elemental	Valoración <sup>b</sup>
Poli(BGMPMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1	2.10-1.70	---- <sup>d</sup>	1.72

<sup>a</sup> Calculado teniendo en cuenta la mezcla de reacción y el rendimiento de la polimerización.

<sup>b</sup> Titración con bromuro de tetraetil amonio y ácido perclórico en presencia de cristal violeta.

<sup>d</sup> En estos casos no se realizó el cálculo del grado de epoxidación por análisis elemental debido a que tanto los monómeros como los crosslinker poseían heteroátomos.

## b) Caracterización de los grupos epóxido mediante espectroscopia de infrarrojo (ATR/FT-IR).

En la Figura 83 se muestra el espectro obtenido mediante ATR del polímero caracterizado. En el espectro se pueden observar las señales características de polímeros funcionalizados con grupos epóxido: una banda a  $957\text{ cm}^{-1}$  característica de la absorción por grupos epóxido y una banda a  $1252\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la vibración del grupo epóxido (banda de vibración C-O de un éter cíclico).

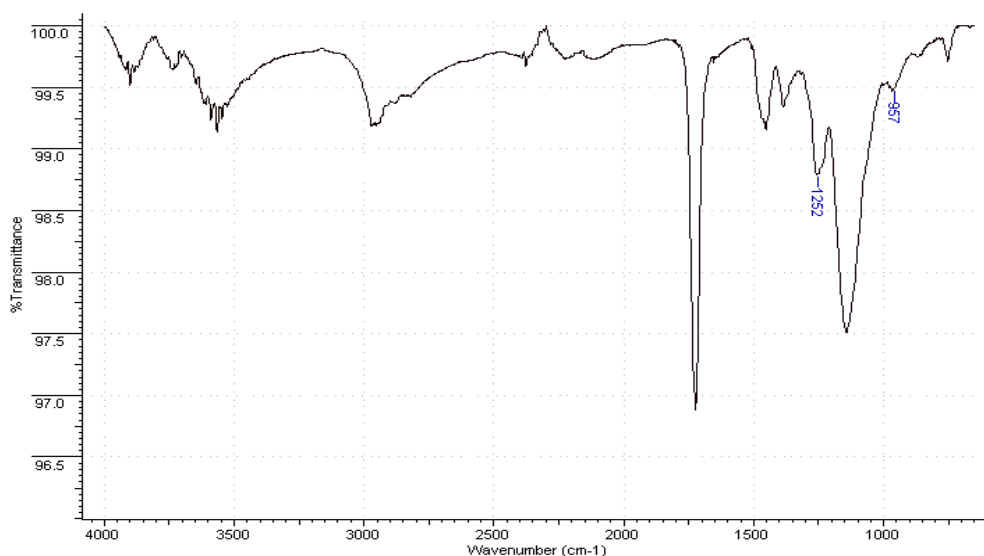


Figura 83. Espectro ATR del polímero poli(BGMPMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1.

## 2. Comportamiento térmico: Análisis termogravimétrico (TGA).

En la Figura 84, se puede observar que el polímero caracterizado presenta una excelente estabilidad térmica hasta los  $150^{\circ}\text{C}$ , más allá de esta temperatura el material comienza a descomponerse y su pérdida de peso se hace evidente. Se observan dos etapas principales de pérdida de peso, la primera, con un pequeño hombro, a  $150^{\circ}\text{C}$ , parece ser una combinación de descomposiciones, correspondientes a la liberación de grupos bis [(glicidiloxi) metil] propiloxi, y dimetil aminoetanol, y la segunda, a una temperatura de  $340^{\circ}\text{C}$ , corresponde a la liberación de productos de polimerización metacrílica.

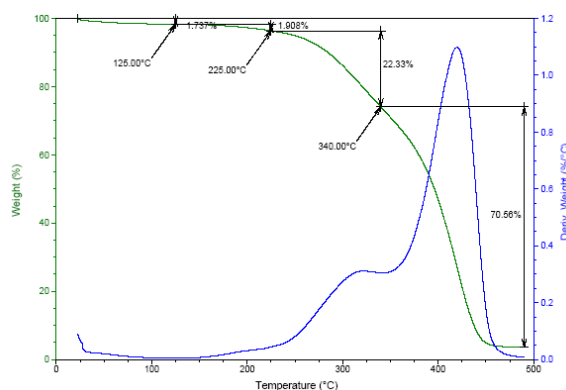


Figura 84. Análisis termogravimétrico de poli(BGMPMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1.

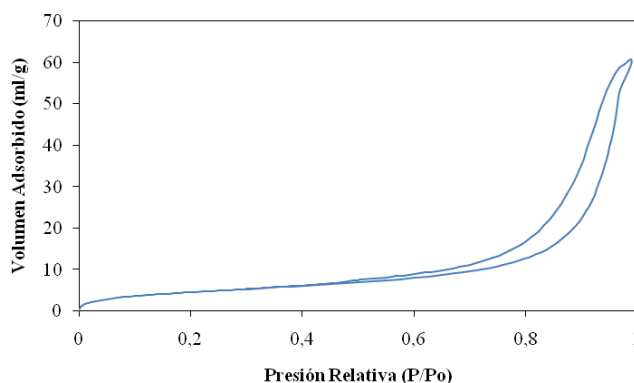
### 3. Caracterización textural.

Con las técnicas de adsorción-desorción de nitrógeno (empleando el método BJH <sup>507, 508</sup>) y microscopía electrónica de barrido se determinaron las propiedades texturales de los polímeros sintetizados.

#### a) Isotherma de adsorción-desorción de nitrógeno.

La isoterma de adsorción-desorción de nitrógeno de este polímero es de tipo IV según la clasificación BET, <sup>506</sup> anteriormente mencionada, en la que se observa un ciclo de histéresis perteneciente al tipo H1, que se ha descrito en morfologías que tienen distribuciones de poro muy angostas o aglomerados de partículas esféricas de tamaños y distribuciones aproximadamente uniformes (Figura 85).

Las ramas de adsorción y desorción de la isoterma son paralelas y llegan a unirse aproximadamente en el punto donde comienza la zona intermedia lineal ( $P/P_0$ : 0.48  $\rightarrow$  Radio de poro mesoporoso: 13.7 nm), presentando un pequeño ciclo de histéresis. Estos fenómenos de histéresis que aparecen en la zona de desorción de la multicapa están asociados a la condensación capilar en estructuras mesoporosas.



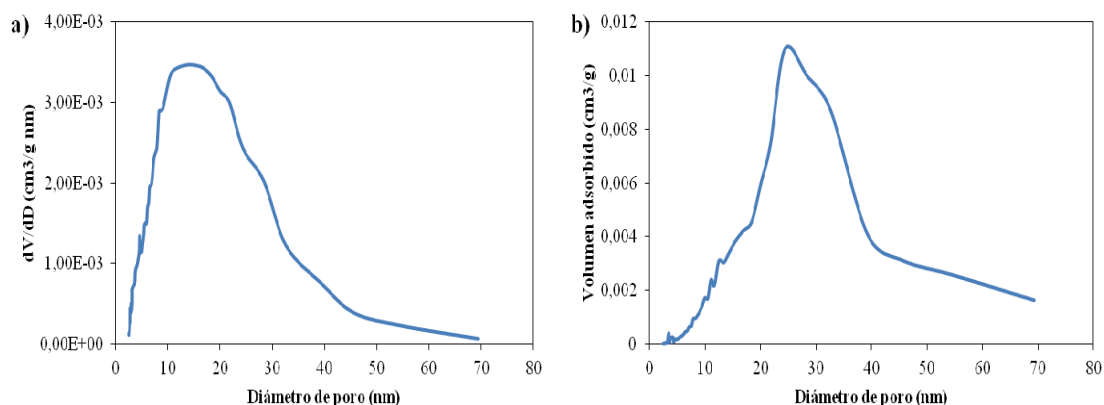
**Figura 85.** Isotherma de adsorción de nitrógeno del polímero poli(BGMPMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1.

#### b) Distribución de poro.

En la Figura 86 se presenta la distribución de poro y en la Tabla 68 se representa la distribución del volumen de poro de este polímero. Como se puede observar este polímero es mayoritariamente mesoporoso y los mesoporos de gran tamaño contribuyen significativamente al volumen de poro del soporte.

**Tabla 68.** Distribución del volumen de poro agrupando los poros por grupos de tamaño.

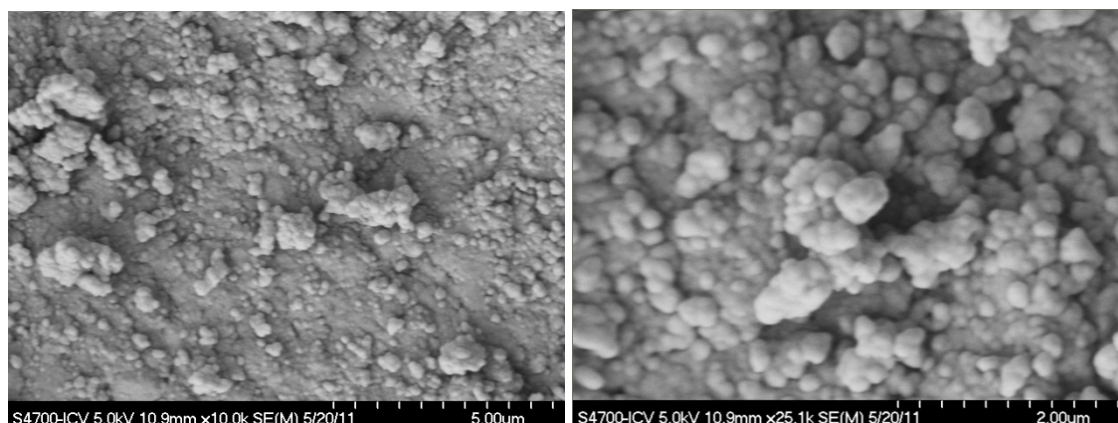
<b>Diámetro (nm)</b>	<b>&lt; 5</b>	<b>5-10</b>	<b>10-15</b>	<b>15-20</b>	<b>20-30</b>	<b>30-50</b>	<b>50-100</b>	<b>&gt;100</b>
<b>Distribución del volumen de poro (%vol.)</b>	3,42	6,35	8,96	7,68	18,20	29,38	15,82	10,19



**Figura 86.** Distribución de poro determinado a partir de los datos de adsorción empleando el método BJH.<sup>507, 508</sup> a) Distribución del tamaño de poro. b) Distribución del volumen de poro.

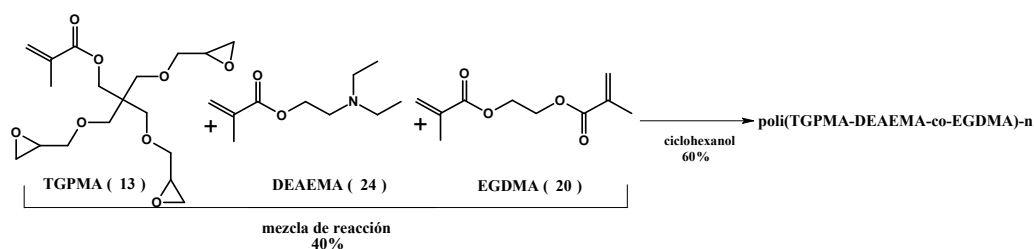
### c) Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

En la Figura 87 se muestran las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido del polímero poli (BGMPMA-DEAEMA-*co*-EGDMA)-1. La morfología encontrada es típica de agregados de partículas, pero en este caso parece que el material no es tan poroso como en los anteriores casos, dato que confirma los bajos valores de superficie específica y volumen de poro del polímero.



**Figura 87.** Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido.

#### 5.3.3.3.A. Síntesis, superficie específica y porosidad de triglicidil metacrilato (TGPMA) (13) y DEAEMA (24) con EGDMA (20): poli(TGPMA-DMAEMA-*co*-EGDMA)-n.



**Esquema 57.** Síntesis de poli(TGPMA-DEAEMA-*co*-EGDMA)-n.

En la polimerización de la mezcla de monómeros TGPMA y DEAEMA (Esquema 57), se obtuvieron resultados muy similares a los obtenidos con la mezcla BGMPMA y DEAEMA, como se puede observar en la Tabla 69.

En este caso, también se han obtenido polímeros con una superficie específica inferior a  $1\text{ m}^2/\text{g}$  en la mayoría de las entradas. De estos datos, tampoco se pueden sacar unas conclusiones sobre la influencia de las variables en las propiedades físicas de los polímeros, excepto que la introducción de un monómero funcionalizado con un grupo amino empeora las propiedades texturales de los polímeros.

Como sucedió en las polimerizaciones anteriores, el polímero que presenta mejores propiedades texturales es la entrada  $n=1$ , por lo que es el elegido para llevar a cabo las pruebas de inmovilización de enzimas. A continuación se expone un estudio de reproducibilidad de la técnica de polimerización y una caracterización más detallada de este polímero.

**Tabla 69.** Síntesis y propiedades texturales de poli(TGPMA-DEAEMA-co-EGDMA)- $n$  ( $n=1-12$ ).

Entrada	Mezcla de reacción			% Iniciador	T <sup>a</sup> (°C)	Rto. (%)	Volumen de poro (cm <sup>3</sup> /g)	Tamaño de poro (nm)	Superficie BET (m <sup>2</sup> /g)	R
	% TGPMA (13)	% DEAEMA	% crosslinker (EGDMA)							
1	30	30	40	1% AIBN	50	96,1	0,09	23,2	16,8	1,38
2	30	30	40	5% AIBN	50	98,5	0,02	24,5	3,0	8,17
3	30	30	40	10% AIBN	50	>99	0,02	29,8	2,4	12,42
4	30	30	40	1% AIBN	70	>99	-	-	-	-
5	30	30	40	5% AIBN	70	>99	-	-	-	-
6	30	30	40	10% AIBN	70	>99	-	-	-	-
7	35	35	30	1% AIBN	50	>99	-	-	-	-
8	35	35	30	5% AIBN	50	>99	-	-	-	-
9	35	35	30	10% AIBN	50	>99	-	-	-	-
10	35	35	30	1% AIBN	70	>99	-	-	-	-
11	35	35	30	5% AIBN	70	>99	-	-	-	-
12	35	35	30	10% AIBN	70	>99	-	-	-	-

% Expresa el porcentaje en peso.

**Rto.:** Rendimiento de la polimerización.

**R:** Relación tamaño de poro/superficie específica.

-: Polímeros con una superficie menor a  $1\text{ m}^2/\text{g}$ .

- **Estudio de reproducibilidad del método de polimerización.**

El estudio de reproducibilidad se llevó a cabo realizando 5 polimerizaciones en días diferentes, bajo las mismas condiciones, obteniéndose una elevada reproducibilidad del método de polimerización. En la Tabla 70 se muestran los resultados obtenidos en este estudio.

**Tabla 70.** Resultados obtenidos en el estudio de reproducibilidad del método de polimerización.

Polimerización	Rto. (%)	Volumen de poro (cm <sup>3</sup> /g)	Tamaño de poro (nm)	Superficie BET (m <sup>2</sup> /g)
1 <sup>a</sup> polimerización	96,1	0,09	23,2	16,8
2 <sup>a</sup> polimerización	98,0	0,07	24,7	15,3
3 <sup>a</sup> polimerización	94,3	0,13	21,2	19,6
4 <sup>a</sup> polimerización	99,1	0,05	25,3	14,8
5 <sup>a</sup> polimerización	95,2	0,11	20,9	17,7
Desviación estándar	1,8	0,03	1,8	1,7

Rto.: Rendimiento de la polimerización.

%: Representa el porcentaje en peso.

### 5.3.3.3.3.B. Caracterización de poli(TGPMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1.

#### 1. Análisis y caracterización de los grupos epóxido.

##### a) Determinación del grado de epoxidación del polímero.

Como se observa en la Tabla 71, el resultado de la valoración de los grupos epóxido concuerda con el margen teórico obtenido teniendo en cuenta la mezcla y el rendimiento de la polimerización.

**Tabla 71.** Grado de epoxidación poli(TGPMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1.

Polímero	Grado de epoxidación (mmol epóxido/g de polímero)		
	Teórico <sup>a</sup>	Análisis elemental	Valoración <sup>b</sup>
Poli(TGPMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1	2.50-2.10	---- <sup>d</sup>	2.10

<sup>a</sup> Calculado teniendo en cuenta la mezcla de reacción y el rendimiento de la polimerización.

<sup>b</sup> Tritiación con bromuro de tetraetil amonio y ácido perclórico en presencia de cristal violeta.

<sup>d</sup> En estos casos no se realizó el cálculo del grado de epoxidación por análisis elemental debido a que tanto los monómeros como los crosslinker poseían heteroátomos.

##### b) Caracterización de los grupos epóxido mediante espectroscopia de infrarrojo (ATR/FT-IR).

En la Figura 88 se muestra el espectro obtenido mediante ATR del polímero caracterizado. En el espectro se pueden observar las señales características de polímeros funcionalizados con grupos epóxido: una banda a 1001 cm<sup>-1</sup> característica de la absorción por grupos epóxido y una banda a 1215 cm<sup>-1</sup> correspondiente a la vibración del grupo epóxido (banda de vibración C-O de un éter cíclico).

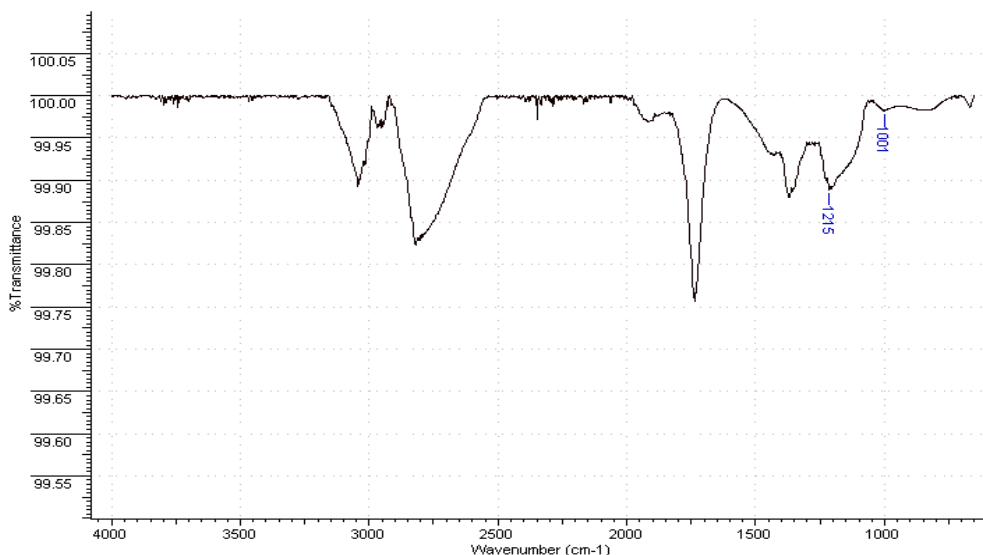


Figura 88. Espectro ATR del polímero poli(TGPMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1.

## 2. Comportamiento térmico: Análisis termogravimétrico (TGA).

En la Figura 89, se puede observar que el polímero caracterizado presenta una excelente estabilidad térmica hasta los 120°C, más allá de esta temperatura el material comienza a descomponerse y su pérdida de peso se hace evidente. Se observa una única pérdida de peso fundamentalmente, con un hombro, a 250°C, parece ser una combinación de descomposiciones, correspondientes a la liberación de grupos triglicidil pentaeritroxi y dimetil aminoetanol, y la liberación de productos de polimerización metacrílica.

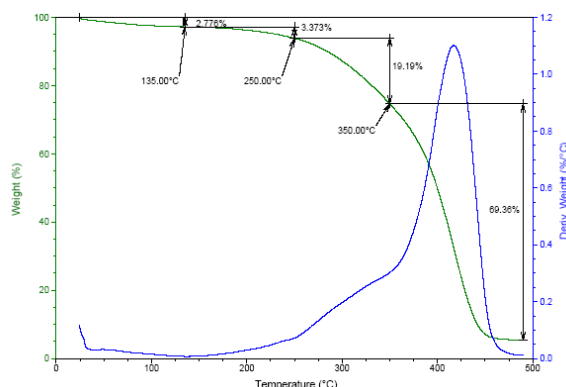


Figura 89. Análisis termogravimétrico del polímero poli(TGPMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1.

## 3. Caracterización textural.

Con las técnicas de adsorción-desorción de nitrógeno (empleando el método BJH<sup>507, 508</sup>) y microscopía electrónica de barrido se determinaron las propiedades texturales de los polímeros sintetizados.

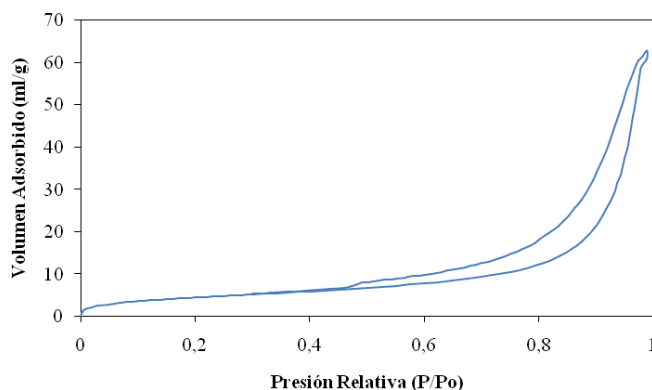
### a) Isotherma de adsorción-desorción de nitrógeno.

La isoterma de adsorción-desorción de nitrógeno de este polímero es de tipo IV según la clasificación BET,<sup>506</sup> anteriormente mencionada, en la que se observa un ciclo de histéresis



pertenciente al tipo H1, que se ha descrito en morfologías que tienen distribuciones de poro muy angostas o aglomerados de partículas esféricas de tamaños y distribuciones aproximadamente uniformes (Figura 90).

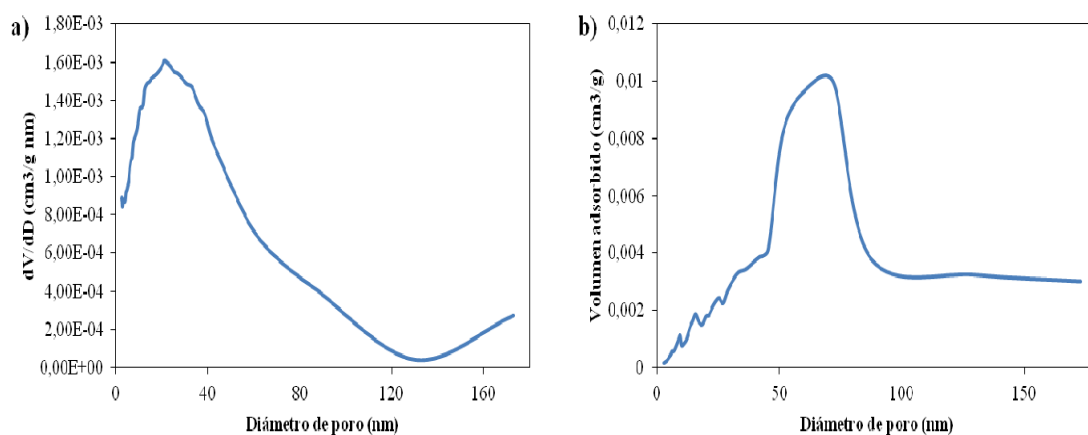
Las ramas de adsorción y desorción de la isoterma son paralelas y llegan a unirse aproximadamente en el punto donde comienza la zona intermedia lineal ( $P/P_0$ : 0.46  $\rightarrow$  Radio de poro mesoporoso: 12.9 nm), presentando un pequeño ciclo de histéresis. Estos fenómenos de histéresis que aparecen en la zona de desorción de la multicapa están asociados a la condensación capilar en estructuras meso porosas.



**Figura 90.** Isotherma de adsorción de nitrógeno del polímero poli(TGPMA-DEAEMA-*co*-EGDMA)-1.

### b) Distribución de poro.

En la Figura 91 se presenta la distribución de poro y en la Tabla 72 se representa la distribución del volumen de poro de este polímero. Como se puede observar este soporte es mayoritariamente mesoporoso y los mesoporos de gran tamaño contribuyen de forma significativa al volumen de poro de este polímero.



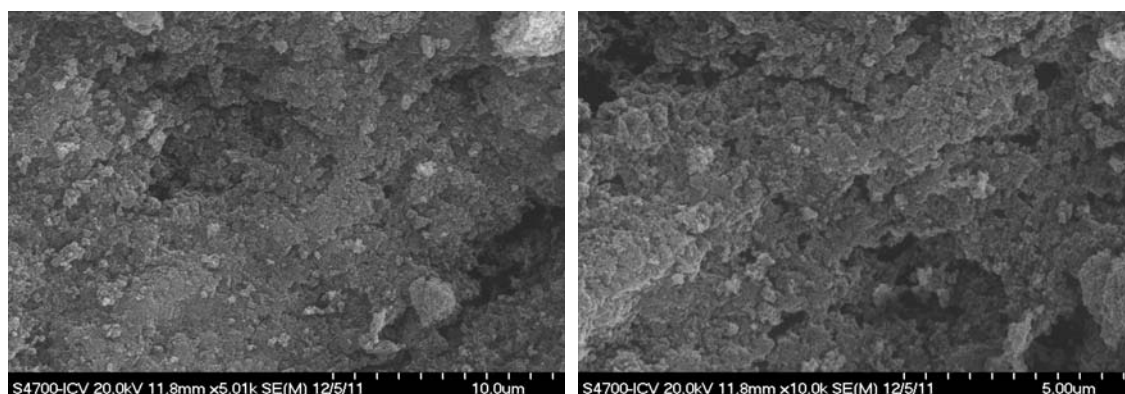
**Figura 91.** Distribución de poro determinado a partir de los datos de adsorción empleando el método BJH.<sup>507, 508</sup> a) Distribución del tamaño de poro. b) Distribución del volumen de poro.

**Tabla 72.** Distribución del volumen de poro agrupando los poros por grupos de tamaño.

Diámetro (nm)	< 5	5-10	10-15	15-20	20-30	30-50	50-100	>100
Distribución del volumen de poro (%vol.)	3,26	5,78	8,14	7,00	16,25	22,71	30,23	6,63

### c) SEM (Microscopía Electrónica de Barrido).

En la Figura 92 se muestran las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido del polímero poli(TGPMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1. La morfología encontrada es típica de agregados de partículas, con poros interconectados formados en el espacio interparticular.



**Figura 92.** Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido.

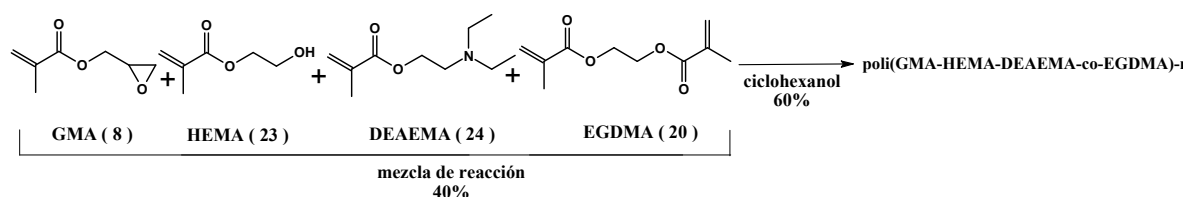
#### 5.3.3.3.4. Resumen comparativo de las polimerizaciones de metacriloxiranos y monómero metacrílico con un grupo amino, con agente de entrecruzamiento metacrílico.

- El monómero que origina los polímeros con mejores propiedades texturales es el glicidil metacrilato (GMA) (**8**), a continuación el triglicidil pentaeritritil metacrilato (**13**), y por último el {{2,2-bis [(glicidiloxi) metil]} propil} metacrilato (**12**).
- El porcentaje relativo de monómero y agente de entrecruzamiento que dan lugar a los mejores resultados es de 60/40.
- El mejor porcentaje de iniciador radicalario es de 1% para los tres monómeros.
- La temperatura de polimerización ideal es de 50°C para los tres monómeros.
- El rendimiento obtenido este grupo de polimerizaciones es muy similar en todos los casos, y aumenta según aumenta el grado de funcionalización de los monómeros.

### 5.3.3.4. Síntesis, superficie específica y porosidad de metacriloxiranos, monómero metacrílico con un grupo hidroxilo y monómero metacrílico con un grupo amino con agente de entrecruzamiento metacrílico.

Por último, se ha decidido realizar un grupo de polimerización incluyendo los tres tipos de monómeros funcionalizados con el objetivo de dar lugar a unos polímeros que presente alta hidrofiliicidad a la vez que posean capacidad de intercambio aniónico.

#### 5.3.4.4.1.A. Síntesis, superficie específica y porosidad de GMA (8), HEMA (23) y DEAEMA (24) con EGDMA (20): poli(GMA-HEMA-DEAEMA-co-EGDMA).



**Esquema 58.** Síntesis de poli(GMA-HEMA-DEAEMA-co-EGDMA)-n.

Se mantiene como iniciador radicalario el AIBN (1%-10%) y las temperaturas de 50°C y 70°C; y los porcentajes de monómeros aparecen detallados en la Tabla 73 junto con los resultados obtenidos en estas polimerizaciones.

Analizando los resultados obtenidos en estas polimerizaciones, se pueden observar que al aumentar el porcentaje de mezcla de monómeros, aumenta el tamaño de poro y disminuye la superficie específica. El porcentaje relativo que da lugar a los polímeros con mejores propiedades físicas es de 70/30.

**Tabla 73.** Síntesis de propiedades texturales de poli(GMA-HEMA-DEAEMA-co-EGDMA)-n (n= 1-12).

Entrada (n)	Mezcla de reacción				% Iniciador	T <sup>a</sup> (°C)	Rto. (%)	Volumen de poro (cm <sup>3</sup> /g)	Tamaño de poro (nm)	Superficie BET (m <sup>2</sup> /g)	R
	% GMA	% HEMA	% DEAEMA	% EGDMA							
1	30	15	15	40	1% AIBN	50	89,9	0,36	21,8	68,1	0,32
2	30	15	15	40	5% AIBN	50	93,1	0,37	22,5	67,7	0,33
3	30	15	15	40	10% AIBN	50	91,3	0,39	22,8	72,2	0,32
4	30	15	15	40	1% AIBN	70	91,8	0,29	17,2	70,4	0,24
5	30	15	15	40	5% AIBN	70	98,7	-	-	-	-
6	30	15	15	40	10% AIBN	70	> 99	-	-	-	-
7	40	15	15	30	1% AIBN	50	59,6	0,20	24,2	35,0	0,69
8	40	15	15	30	5% AIBN	50	95,3	0,33	24,3	56,4	0,43
9	40	15	15	30	10% AIBN	50	95,8	0,34	27,6	51,2	0,54
10	40	15	15	30	1% AIBN	70	98,1	0,15	20,6	30,4	0,68
11	40	15	15	30	5% AIBN	70	97,0	-	-	-	-
12	40	15	15	30	10% AIBN	70	> 99	-	-	-	-

% Expresa el porcentaje en peso.

**Rto.:** Rendimiento de la polimerización.

**R:** Relación tamaño de poro/superficie específica.

-: Polímeros con una superficie menor a 1 m<sup>2</sup>/g.

Respecto al iniciador radicalario, al aumentar el porcentaje de iniciador aumenta el tamaño de poro, mientras que la superficie específica no presenta un comportamiento regular con la variación del porcentaje de iniciador.

Al aumentar la temperatura empeoran las propiedades texturales de los polímeros. Los mejores resultados se han obtenido a una temperatura de 50°C

El polímero que presenta mejores propiedades texturales es la entrada n= 9, por lo que es el elegido para llevar a cabo las pruebas de inmovilización de enzimas. A continuación se expone un estudio de reproducibilidad del método de polimerización y una caracterización más detallada de este polímero poli(GMA-HEMA-DEAEMA-co-EGDMA)-9.

- **Estudio de reproducibilidad del método de polimerización.**

El estudio de reproducibilidad se llevó a cabo realizando 5 polimerizaciones en días diferentes, bajo las mismas condiciones, obteniéndose una elevada reproducibilidad del método de polimerización. En la Tabla 74 se muestran los resultados obtenidos en este estudio.

**Tabla 74.** Resultados obtenidos en el estudio de reproducibilidad del método de polimerización.

Polimerización	Rto. (%)	Volumen de poro (cm <sup>3</sup> /g)	Tamaño de poro (nm)	Superficie BET (m <sup>2</sup> /g)
1 <sup>a</sup>	95,8	0,34	27,6	51,2
2 <sup>a</sup>	94,1	0,35	26,9	55,7
3 <sup>a</sup>	95,2	0,33	28,0	50,6
4 <sup>a</sup>	97	0,37	27,2	53,9
5 <sup>a</sup>	92,3	0,40	25,1	56,3
<b>Desviación estándar</b>	1,6	0,02	1,0	2,3

Rto.: Rendimiento de la polimerización.

%: Representa el porcentaje en peso.

#### 5.3.4.4.1.B. Caracterización de poli(GMA-HEMA-DEAEMA-co-EGDMA)-9.

##### 1. Análisis y caracterización de los grupos epóxido.

###### a) Determinación del grado de epoxidación del polímero.

Como se observa en la Tabla 75, el resultado de la valoración de los grupos epóxido concuerda con el margen teórico obtenido teniendo en cuenta la mezcla y el rendimiento de la polimerización.

**Tabla 75.** Grado de epoxidación de poli(GMA-HEMA-DEAEMA-co-EGDMA)-9.

Polímero	Grado de epoxidación (mmol epóxido/g de polímero)		
	Teórico <sup>a</sup>	Análisis elemental	Valoración <sup>b</sup>
<b>Poli(GMA-HEMA-DEAEMA-co-EGDMA)-9</b>	2.90-2.60	---- <sup>d</sup>	2.67

<sup>a</sup> Calculado teniendo en cuenta la mezcla de reacción y el rendimiento de la polimerización.

<sup>b</sup> Tritiación con bromuro de tetraetil amonio y ácido perclórico en presencia de cristal violeta.

<sup>d</sup> En estos casos no se realizó el cálculo del grado de epoxidación por análisis elemental debido a que tanto los monómeros como los crosslinker poseían heteroátomos.

## b) Caracterización de los grupos epóxido mediante espectroscopia de infrarrojo (ATR/FT-IR).

En la Figura 93 se muestra el espectro obtenido mediante ATR del polímero caracterizado. En el espectro se pueden observar las señales características de polímeros funcionalizados con grupos epóxido y grupos hidroxilo: una banda correspondiente al stretching  $-OH$  a  $3567\text{ cm}^{-1}$ , una banda a  $969\text{ cm}^{-1}$  característica de la absorción por grupos epóxido y una banda a  $1228\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la vibración del grupo epóxido ( banda de vibración C-O de un éter cíclico).

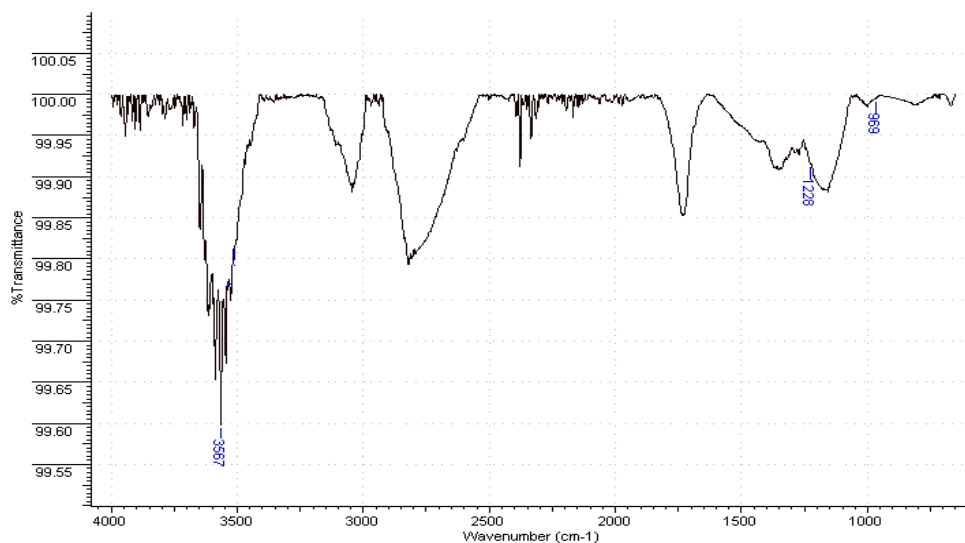


Figura 93. Espectro ATR del polímero poli(GMA-HEMA-DEAEMA-*co*-EGDMA)-9.

## 2. Comportamiento térmico: Análisis termogravimétrico (TGA).

En la Figura 94, se puede observar que el polímero caracterizado presenta una excelente estabilidad térmica hasta los  $100^{\circ}\text{C}$ , más allá de esta temperatura el material comienza a descomponerse y su pérdida de peso se hace evidente. Se observan dos etapas principales de pérdida de peso, la primera, a  $245^{\circ}\text{C}$ , parece ser una combinación de descomposiciones, correspondientes a la liberación de grupos glicidiloxi, etanodiol, y dimetil aminoetanol, y la segunda, a una temperatura de  $342^{\circ}\text{C}$ , corresponde a la liberación de productos de polimerización metacrílica.

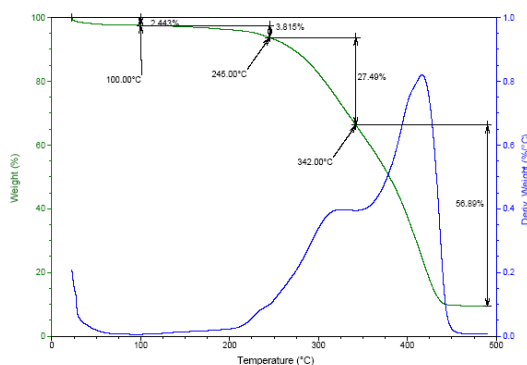


Figura 94. Análisis termogravimétrico del polímero poli(GMA-HEMA-DEAEMA-*co*-EGDMA)-9.

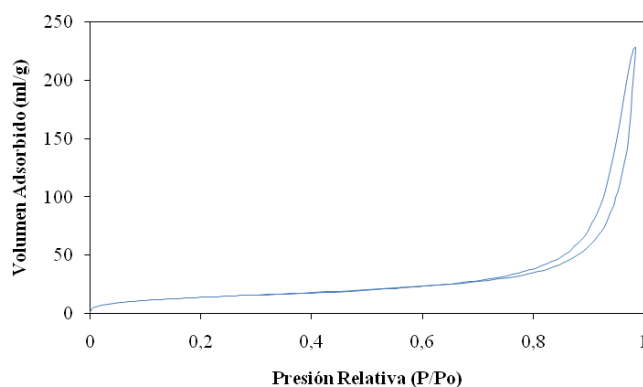
### 3. Caracterización textural.

Con las técnicas de adsorción-desorción de nitrógeno (empleando el método BJH <sup>507, 508</sup>) y microscopía electrónica de barrido se determinaron las propiedades texturales de los polímeros sintetizados.

#### a) Isotherma de adsorción-desorción de nitrógeno.

La isoterma de adsorción-desorción de nitrógeno de este polímero es de tipo IV según la clasificación BET, <sup>506</sup> anteriormente mencionada, en la que se observa un ciclo de histéresis perteneciente al tipo H1, que se ha descrito en morfologías que tienen distribuciones de poro muy angostas o aglomerados de partículas esféricas de tamaños y distribuciones aproximadamente uniformes (Figura 95).

Las ramas de adsorción y desorción de la isoterma son paralelas y llegan a unirse aproximadamente en el punto donde comienza la zona intermedia lineal ( $P/P_0$ : 0.72  $\rightarrow$  Radio de poro mesoporoso: 29.9 nm), presentando un pequeño ciclo de histéresis. Estos fenómenos de histéresis que aparecen en la zona de desorción de la multicapa están asociados a la condensación capilar en estructuras mesoporosas.



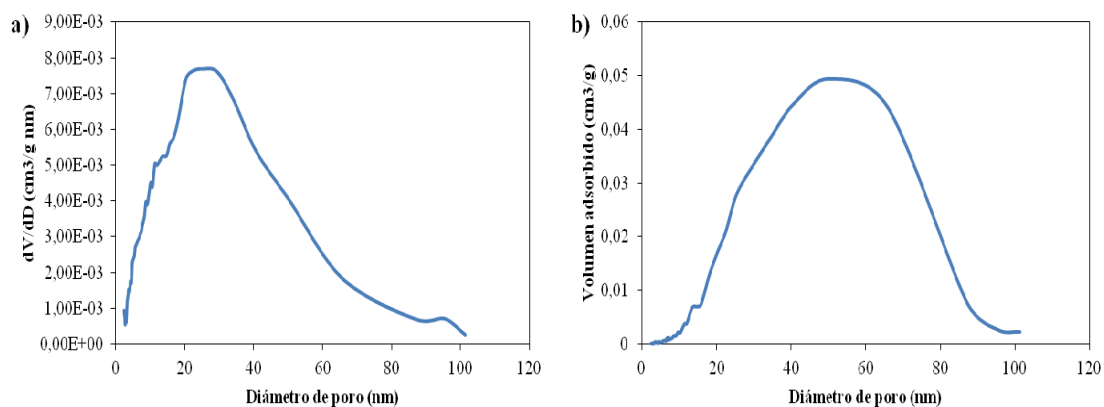
**Figura 95.** Isotherma de adsorción de nitrógeno del poli(GMA-HEMA-DEAEMA-*co*-EGDMA)-9.

#### b) Distribución de poro.

En la Figura 96 se presenta la distribución de poro y en la Tabla 76 se representa la distribución del volumen de poro de este polímero. Como se puede observar este polímero es mayoritariamente mesoporoso y los mesoporos de gran tamaño contribuyen significativamente al volumen de poro del soporte.

**Tabla 76.** Distribución del volumen de poro agrupando los poros por grupos de tamaño.

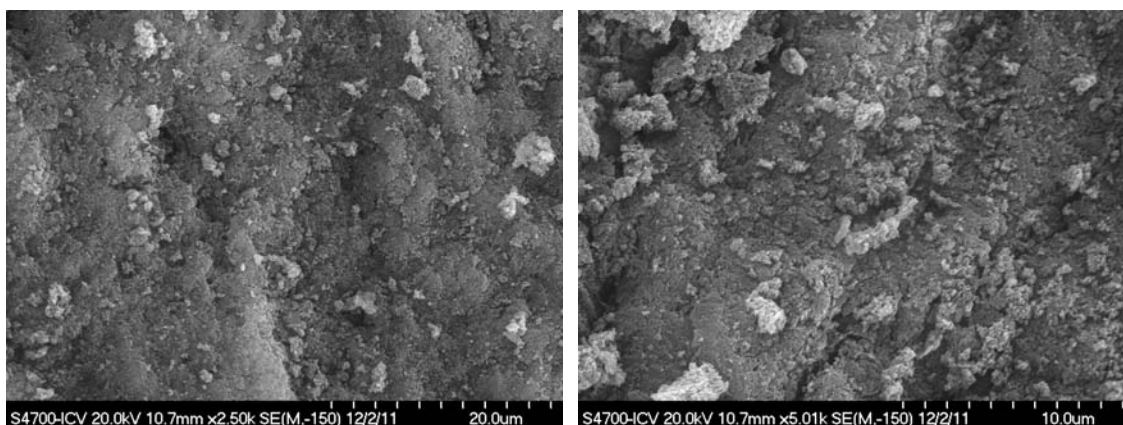
Diámetro (nm)	< 5	5-10	10-15	15-20	20-30	30-50	50-100	>100
Distribución del volumen de poro (%vol.)	2,49	3,69	5,06	5,54	10,86	19,57	42,98	9,81



**Figura 96.** Distribución de poro determinado a partir de los datos de adsorción empleando el método BJH.<sup>507, 508</sup> a) Distribución del tamaño de poro. b) Distribución del volumen de poro.

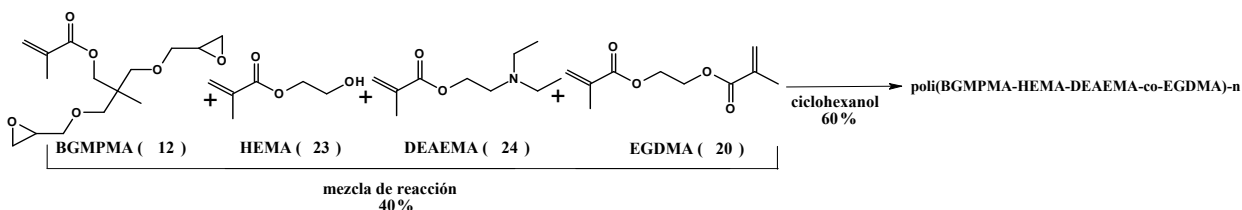
**c) Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).**

En la Figura 97 se muestran las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido del polímero poli (GMA-HEMA-DEAEMA-*co*-EGDMA)-9. La morfología encontrada es típica de agregados de partículas, con poros interconectados formados en el espacio interparticular.



**Figura 97.** Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido.

**5.3.3.4.2.A. Síntesis, superficie específica y porosidad de {{2,2-bis [(glicidiloxi) metil]} propil} metacrilato (BGMPMA) (12), HEMA (23) y DEAEMA (24) con EGDMA (20): poli(BGMPMA-HEMA-DEAEMA-*co*-EGDMA)-n.**



**Esquema 59.** Síntesis de poli(BGMPMA-HEMA-DEAEMA-*co*-EGDMA)-n.

Siguiendo con la metodología propuesta en el Plan de trabajo, se realizaron las polimerizaciones con las mezclas de tres monómeros, empleando como monómero metacriloxirano el BGMPMA (12) (Esquema 59).

**Tabla 77.** Síntesis y propiedades texturales de poli(BGMPMA-HEMA-DEAEMA-co-EGDMA)-n (n= 1-12).

Entrada (n)	Mezcla de reacción				% Iniciador	T <sup>a</sup> (°C)	Rto. (%)	Volumen de poro (cm <sup>3</sup> /g)	Tamaño de poro (nm)	Superficie BET (m <sup>2</sup> /g)	R
	% (12)	% (23)	% (24)	% (20)							
1	30	15	15	40	1% AIBN	50	92,5	0,02	33,4	2,4	13,9
2	30	15	15	40	5% AIBN	50	93,8	0,02	30,6	2,6	11,7
3	30	15	15	40	10% AIBN	50	98,0	-	-	-	-
4	30	15	15	40	1% AIBN	70	> 99	-	-	-	-
5	30	15	15	40	5% AIBN	70	> 99	-	-	-	-
6	30	15	15	40	10% AIBN	70	> 99	-	-	-	-
7	40	15	15	30	1% AIBN	50	> 99	-	-	-	-
8	40	15	15	30	5% AIBN	50	> 99	-	-	-	-
9	40	15	15	30	10% AIBN	50	> 99	-	-	-	-
10	40	15	15	30	1% AIBN	70	> 99	-	-	-	-
11	40	15	15	30	5% AIBN	70	> 99	-	-	-	-
12	40	15	15	30	10% AIBN	70	> 99	-	-	-	-

% Expresa el porcentaje en peso.

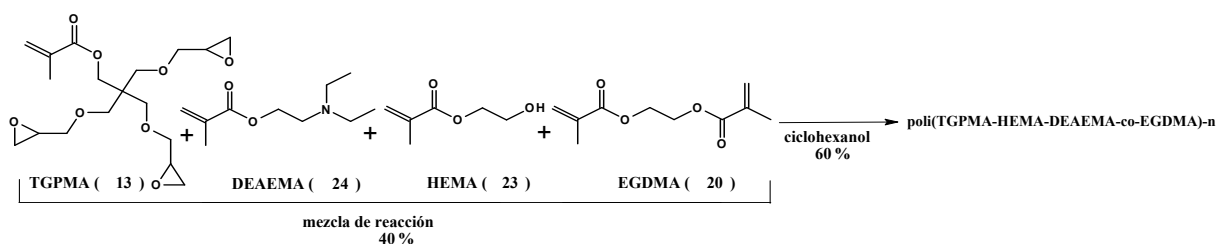
Rto.: Rendimiento de la polimerización.

R: Relación tamaño de poro/superficie específica.

-: Polímeros con una superficie menor a 1 m<sup>2</sup>/g.

Los polímeros obtenidos en este grupo de polimerización presentaron superficies muy bajas (ver Tabla 77), por lo que no se va a seleccionar ninguno de ellos para las pruebas de inmovilización de enzimas, por lo tanto, no se van a caracterizar.

#### 5.3.4.4.3.A. Síntesis, superficie específica y porosidad de triglicidil pentaeritritil metacrilato (TGPMA) (13), HEMA (23) y DEAEMA (24) con EGDMA (20): poli(TGPMA-HEMA-DEAEMA-co-EGDMA)-n.



**Esquema 60.** Síntesis de poli(TGPMA-HEMA-DEAEMA-co-EGDMA)-n.

Para finalizar se llevaron a cabo las polimerizaciones con la mezcla de los tres polímeros, empleando en este caso como monómero epoxidado el TGPMA (13) (Esquema 60). Como puede observarse en la Tabla 78, en este caso, tres de las polimerizaciones dieron lugar a polímeros porosos.

En este grupo de polimerización, únicamente se han obtenido polímeros porosos con la mezcla de reacción 30% TGPMA, 15% HEMA, 15% DEAEMA y 15% EGDMA. De estos



datos no se pueden sacar unas conclusiones sobre la influencia de las variables en las propiedades texturales de los polímeros.

**Tabla 78.** Síntesis y propiedades texturales de poli(TGPMA-HEMA-DEAEMA-co-EGDMA)-n (n= 1-12).

Entrada (n)	Mezcla de reacción				% Iniciador	T <sup>a</sup> (°C)	Rto. (%)	Volumen de poro (cm <sup>3</sup> /g)	Tamaño de poro (nm)	Superficie BET (m <sup>2</sup> /g)	R
	% (13)	% (23)	% (24)	% (20)							
1	30	15	15	40	1% AIBN	50	93,7	0,29	22,5	53,4	0,42
2	30	15	15	40	5% AIBN	50	95,3	0,13	18,3	29,3	0,62
3	30	15	15	40	10% AIBN	50	98,1	0,08	24,1	13,3	1,81
4	30	15	15	40	1% AIBN	70	> 99	-	-	-	-
5	30	15	15	40	5% AIBN	70	> 99	-	-	-	-
6	30	15	15	40	10% AIBN	70	> 99	-	-	-	-
7	40	15	15	30	1% AIBN	50	> 99	-	-	-	-
8	40	15	15	30	5% AIBN	50	> 99	-	-	-	-
9	40	15	15	30	10% AIBN	50	> 99	-	-	-	-
10	40	15	15	30	1% AIBN	70	> 99	-	-	-	-
11	40	15	15	30	5% AIBN	70	> 99	-	-	-	-
12	40	15	15	30	10% AIBN	70	> 99	-	-	-	-

% Expresa el porcentaje en peso.

Rto.: Rendimiento de la polimerización.

R: Relación tamaño de poro/superficie específica.

-: Polímeros con una superficie menor a 1 m<sup>2</sup>/g.

El polímero que presenta mejores propiedades texturales es la entrada n= 1, por lo que es el elegido para llevar a cabo las pruebas de inmovilización de enzimas. A continuación se expone un estudio de reproducibilidad de la técnica de polimerización y una caracterización más detallada del poli(TGPMA-HEMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1.

- **Estudio de reproducibilidad del método de polimerización.**

El estudio de reproducibilidad se llevó a cabo realizando 5 polimerizaciones en días diferentes, bajo las mismas condiciones, obteniéndose una elevada reproducibilidad del método de polimerización. En la Tabla 79 se muestran los resultados obtenidos en este estudio.

**Tabla 79.** Resultados obtenidos en el estudio de reproducibilidad de la técnica de polimerización.

Polimerización	Rto. (%)	Volumen de poro (cm <sup>3</sup> /g)	Tamaño de poro (nm)	Superficie BET (m <sup>2</sup> /g)
1 <sup>a</sup>	93,7	0,29	22,5	53,4
2 <sup>a</sup>	94,6	0,2	20,1	51,9
3 <sup>a</sup>	93,5	0,27	21,8	52
4 <sup>a</sup>	92,8	0,25	22,3	53,1
5 <sup>a</sup>	90,5	0,33	24,7	55,3
<b>Desviación estándar</b>	1,38	0,04	1,48	1,23

Rto.: Rendimiento de la polimerización.

%: Representa el porcentaje en peso.

### 5.3.4.4.3.B. Caracterización de poli(TGPMA-HEMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1.

#### 1. Análisis y caracterización de grupos epóxido.

##### a) Determinación del grado de epoxidación del polímero.

Como se observa en la Tabla 80, el resultado de la valoración de los grupos epóxido concuerda con el margen teórico obtenido teniendo en cuenta la mezcla y el rendimiento de la polimerización.

**Tabla 80.** Grado de epoxidación de poli(TGPMA-HEMA-DEAEMA-co-EGDMA)-n

Polímero	Grado de epoxidación (mmol epóxido/g de polímero)		
	Teórico <sup>a</sup>	Análisis elemental	Valoración <sup>b</sup>
<b>Poli(TGPMA-HEMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1</b>	2.60-2.00	---- <sup>d</sup>	2.04

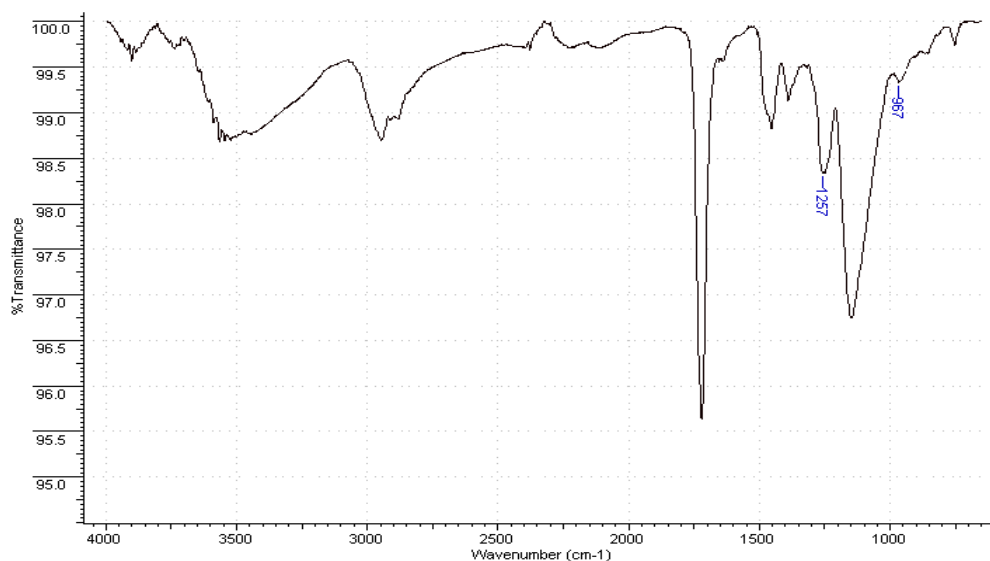
<sup>a</sup> Calculado teniendo en cuenta la mezcla de reacción y el rendimiento de la polimerización.

<sup>b</sup> Titración con bromuro de tetraetil amonio y ácido perclórico en presencia de cristal violeta.

<sup>d</sup> En estos casos no se realizó el cálculo del grado de epoxidación por análisis elemental debido a que tanto los monómeros como los crosslinker poseían heteroátomos.

##### b) Caracterización de los grupos epóxido mediante espectroscopia de infrarrojo (ATR/FT-IR).

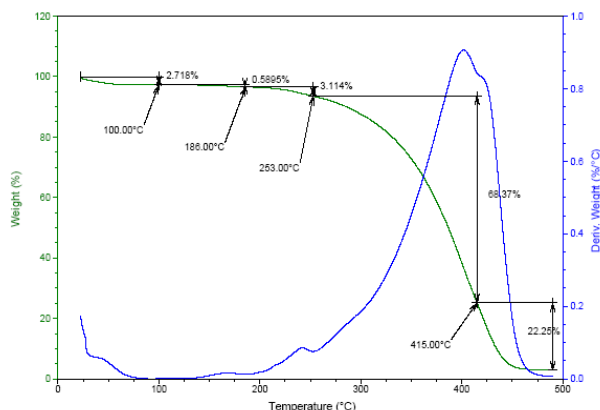
En la Figura 98 se muestra el espectro obtenido mediante ATR del polímero caracterizado. En el espectro se pueden observar las señales características de polímeros funcionalizados con grupos epóxido y grupos hidroxilo: una banda correspondiente al stretching –OH a  $3524\text{ cm}^{-1}$ , una banda a  $967\text{ cm}^{-1}$  característica de la absorción por grupos epóxido y una banda a  $1257\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la vibración del grupo epóxido ( banda de vibración C-O de un éter cíclico).



**Figura 98.** Espectro ATR del polímero poli(TGPMA-HEMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1.

## 2. Comportamiento térmico: Análisis termogravimétrico (TGA).

En la Figura 99, se puede observar que el polímero caracterizado presenta una excelente estabilidad térmica hasta los 140°C, más allá de esta temperatura el material comienza a descomponerse y su pérdida de peso se hace evidente. En este caso, solo se observa una descomposición principal con varios hombros, lo que indica que este polímero descompone de forma más o menos homogénea.



**Figura 99.** Análisis termogravimétrico del polímero poli(TGPMA-HEMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1.

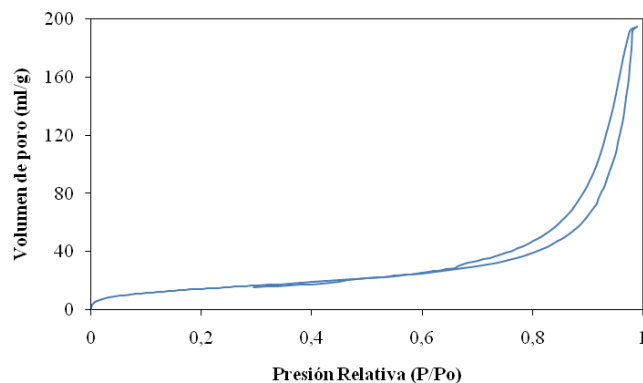
## 3. Caracterización textural.

Con las técnicas de adsorción-desorción de nitrógeno (empleando el método BJH <sup>507, 508</sup>) y microscopía electrónica de barrido se determinaron las propiedades texturales de los polímeros sintetizados.

### a) Isotherma de adsorción-desorción de nitrógeno.

La isoterma de adsorción-desorción de nitrógeno de este polímero es de tipo IV según la clasificación BET, <sup>506</sup> anteriormente mencionada, en la que se observa un ciclo de histéresis perteneciente al tipo H1, que se ha descrito en morfologías que tienen distribuciones de poro muy angostas o aglomerados de partículas esféricas de tamaños y distribuciones aproximadamente uniformes (Figura 100).

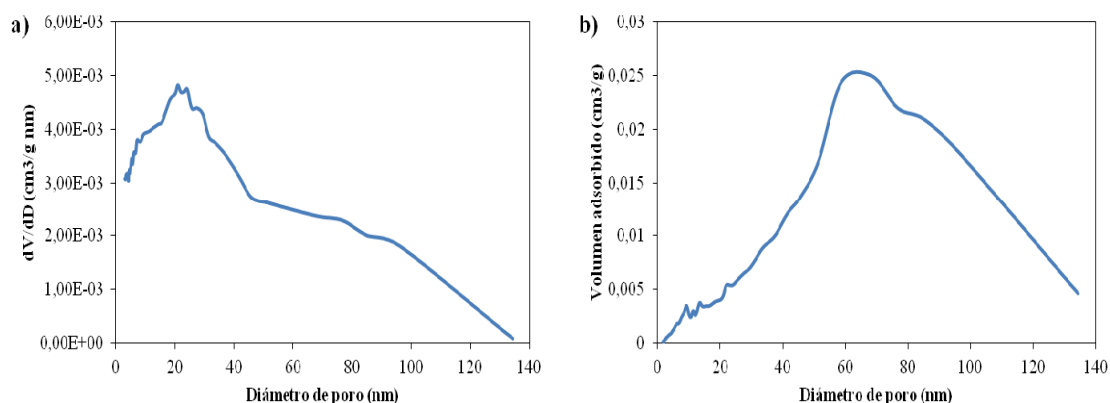
Las ramas de adsorción y desorción de la isoterma son paralelas y llegan a unirse aproximadamente en el punto donde comienza la zona intermedia lineal ( $P/P_0$ : 0.64  $\rightarrow$  Radio de poro mesoporoso: 22.15 nm), presentando un pequeño ciclo de histéresis (Asociados a la condensación capilar en estructuras mesoporosas).



**Figura 100.** Isotherma de adsorción de nitrógeno del poli(TGPMA-HEMA-DEAEMA-*co*-EGDMA)-1.

### b) Distribución de poro.

En la Figura 101 se presenta la distribución de poro y en la Tabla 81 se representa la distribución del volumen de poro de este polímero. Como se puede observar este polímero es mayoritariamente mesoporoso y los mesoporos de gran tamaño contribuyen significativamente al volumen de poro del soporte.



**Figura 101.** Distribución de poro determinado a partir de los datos de adsorción empleando el método BJH.<sup>507, 508</sup> a) Distribución del tamaño de poro. b) Distribución del volumen de poro.

**Tabla 81.** Distribución del volumen de poro agrupando los poros por grupos de tamaño.

Diámetro (nm)	< 5	5-10	10-15	15-20	20-30	30-50	50-100	>100
<b>Distribución del volumen de poro (%vol.)</b>	3,62	6,02	7,56	6,38	15,76	19,53	39,53	1,60

### c) Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

En la Figura 102 se muestran las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido del polímero poli(TGPMA-HEMA-DEAEMA-*co*-EGDMA)-1. La morfología encontrada es típica de agregados de partículas, con poros interconectados formados en el espacio interparticular.

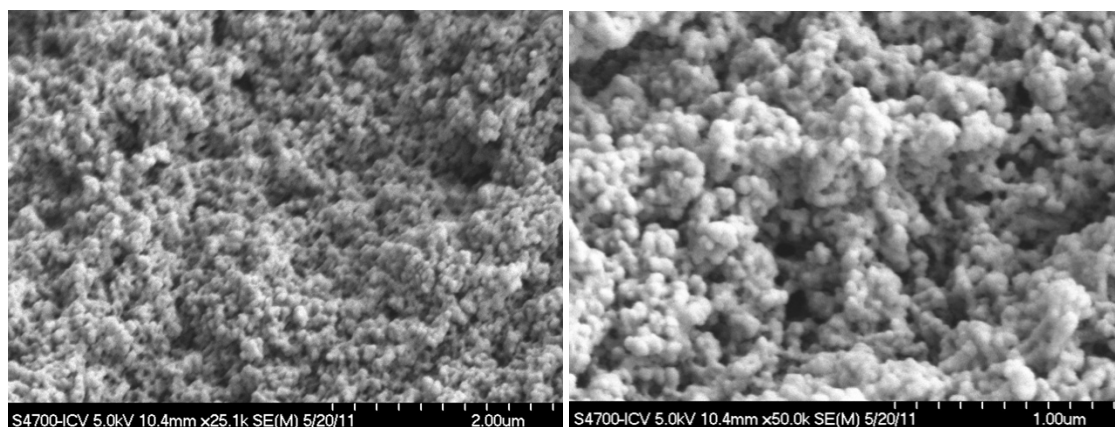


Figura 102. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido.

#### 5.3.3.4.4. Resumen comparativo de las polimerizaciones de metacriloxiranos y monómero funcionalizado con un grupo hidroxilo, monómero funcionalizado con un grupo amino, con agente de entrecruzamiento metacrílico.

- El monómero que origina los polímeros con mejores propiedades texturales es el glicidil metacrilato (GMA) (8) a continuación el triglicidil pentaeritritil metacrilato (TGPMA) (13), y con el {{2,2-bis [(glicidiloxi) metil]} propil} metacrilato (BGMPMA) (12), no se ha obtenido ningún resultado positivo.
- El porcentaje relativo de monómero y agente de entrecruzamiento que dan lugar a los mejores resultados es de 70/30 para el GMA (8) y 60/40 con el monómero TGPMA (13).
- El mejor porcentaje de iniciador radicalario es de 10% para el GMA (8) y 1% con el monómero TGPMA (13).
- La temperatura de polimerización ideal es de 50°C para los dos monómeros
- El rendimiento obtenido este grupo de polimerizaciones es muy similar en todos los casos.

#### 5.3.3.4.5. Resumen comparativo de las polimerizaciones de metacriloxiranos con agente de entrecruzamiento metacrílico.

- El grupo de polimerización que da lugar a los polímeros con mejores propiedades texturales, por lo general, son los originados por la polimerización de monómeros metacriloxiranos con agente de entrecruzamiento metacrílico
- La introducción de un monómero metacrílico funcionalizado con un grupo hidroxilo, da lugar a polímeros con menor tamaño de poro (excepto para el GMA) y menor superficie específica.
- La introducción de un monómero metacrílico funcionalizado con un grupo amino, da lugar a polímeros con menor tamaño de poro (excepto para el GMA) y menor superficie específica (excepto para el TGPMA).

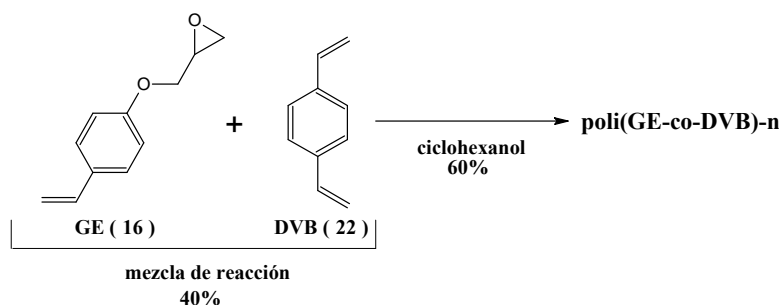
- d) La introducción de un monómero metacrílico funcionalizado con un grupo hidroxilo y un monómero metacrílico funcionalizado con un grupo amino, da lugar a polímeros con menor tamaño de poro (excepto para el GMA) y mayor superficie específica (excepto para el BGMPMA).

### 5.3.4. Síntesis, superficie específica y porosidad de polímeros de ariloxiranos con agente de entrecruzamiento arílico.

Finalmente, se abordó la síntesis de los polímeros más hidrofóbicos, obtenidos a través de la polimerización de los monómeros ariloxiranos y el crosslinker DVB.

#### 5.3.4.1.A. Síntesis, superficie específica y porosidad de polímeros de *p*-glicidiloxi estireno (16) y DVB (22): poli(GE-*co*-DVB)-n.

Siguiendo la misma metodología expuesta para los monómeros alquílicos y metacrílicos, se obtienen los polímeros con monómeros arílicos, empezando por el más sencillo, el compuesto **16**, que presenta un resto olefinico y un grupo epóxido, es decir, el *p*-glicidiloxi estireno (GE) (**16**) (Esquema 61).



**Esquema 61.** Síntesis de poli(GE-*co*-DVB)-n.

El compuesto **16** ha sido previamente empleado por otros grupos de investigación en la síntesis de polímeros con distintas aplicaciones como: aplicaciones en bioquímica,<sup>527</sup> preparación de polímeros antireflectantes empleados en la fabricación de dispositivos semiconductores,<sup>528</sup> preparación de diodos emisores de luz<sup>529</sup> y preparación de materiales dieléctricos resistentes a la desintegración.<sup>530</sup>

Con el objetivo de obtener polímeros con una elevada superficie específica y el mayor tamaño de poro posible, se variaron los porcentajes relativos de monómero y agente de entrecruzamiento y el porcentaje de iniciador respecto a la mezcla de reacción. Los resultados obtenidos aparecen en la Tabla 82.

**Tabla 82.** Síntesis y propiedades texturales de poli(GE-co-DVB)-n (n= 1-4).

Entrada (n)	Mezcla de reacción		% iniciador	T <sup>a</sup> (°C)	Rto. (%)	Volumen de poro (mL/g)	Tamaño de poro (nm)	Superficie BET (m <sup>2</sup> /g)	R
	% GE	% DVB con estabilizante							
1	60	40	1% AIBN	70	95,1	0,54	15,9	143,3	0,11
2	60	40	5%AIBN	70	99,7	0,78	17,0	194,3	0,09
3	75	25	1% AIBN	70	80,5	0,19	22,2	36,5	0,61
4	75	25	5%AIBN	70	94,3	0,43	24,1	73,9	0,33

%: tanto por ciento en peso.

R: Relación tamaño de poro superficie específica.

Este grupo de polimerizaciones transcurre con muy buenos rendimientos, ya que estos monómeros tipo estireno son muy reactivos frente a la polimerización radicalaria, como le ocurre al crosslinker DVB; esto hace que con bajos porcentajes de iniciador radicalario AIBN (1%-5%) y una temperatura de 70°C, se obtengan muy buenos rendimientos.

En general, todos los resultados obtenidos son satisfactorios, observándose que al aumentar la proporción de iniciador radicalario se mejora el rendimiento de las polimerizaciones y aumenta el tamaño de poro. De estos polímeros seleccionamos el de la entrada n= 4, por presentar el mayor tamaño de poro y una superficie específica aceptable, y por lo tanto se lleva a cabo el estudio de reproducibilidad del método de polimerización y la caracterización con este polímero, el poli(GE-co-DVB)-4.

- **Estudio de reproducibilidad del método de polimerización.**

El estudio de reproducibilidad se llevó a cabo realizando 5 polimerizaciones en días diferentes, bajo las mismas condiciones, obteniéndose una elevada reproducibilidad del método de polimerización. En la Tabla 83 se muestran los resultados obtenidos en este estudio.

**Tabla 83.** Resultados obtenidos en el estudio de reproducibilidad método de polimerización.

Polimerización	Rto. (%)	Volumen de poro (mL/g)	Tamaño de poro (nm)	Superficie BET (m <sup>2</sup> /g)
1 <sup>a</sup>	94,3	0,43	24,2	73,9
2 <sup>a</sup>	90,5	0,45	22,3	86,3
3 <sup>a</sup>	92,0	0,39	20,5	90,2
4 <sup>a</sup>	97,1	0,42	25,1	70,1
5 <sup>a</sup>	95,2	0,44	23,9	75,6
<b>Desviación estándar</b>	2,3	0,02	1,6	7,7

Rto.: Rendimiento de la polimerización.

%: Expresa el porcentaje en peso.

### 5.3.4.1.B. Caracterización de poli(*p*-glicidiloxi estireno-co-DVB)-4.

#### 1. Análisis y caracterización de grupos epóxido.

##### a) Análisis elemental.

Poli(GE-co-DVB)-4      C: 81.62%      H:7.43%      O: 10.95%

### b) Determinación del grado de epoxidación del polímero.

Como se observa en la Tabla 84, los resultados de la valoración de los grupos epóxido y del análisis elemental concuerdan con el margen teórico obtenido teniendo en cuenta la mezcla y el rendimiento de la polimerización.

**Tabla 84.** Grado de epoxidación de poli(GE-co-DVB)-4.

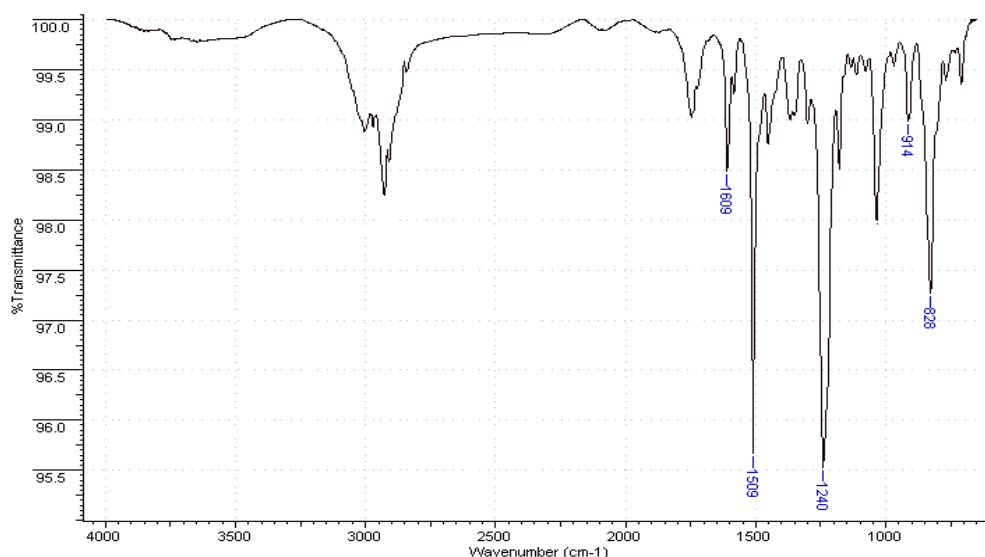
Polímero	Grado de epoxidación (mmol epóxido/g de polímero)		
	Teórico <sup>a</sup>	Análisis elemental	Valoración <sup>b</sup>
<b>Poli(GE-co-DVB)-4</b>	3.40-3.30	3.10	3.22

<sup>a</sup> Calculado teniendo en cuenta la mezcla de reacción y el rendimiento de la polimerización.

<sup>b</sup> Tritiación con bromuro de tetraetil amonio y ácido perclórico en presencia de cristal violeta.

### c) Caracterización de los grupos epóxido mediante espectroscopia de infrarrojo (ATR/FT-IR).

En la Figura 102 se muestra el espectro obtenido mediante ATR del polímero caracterizado. En el espectro se pueden observar las señales características de polímeros funcionalizados con grupos epóxido: una banda a 914  $\text{cm}^{-1}$  característica de la absorción por grupos epóxido, una banda a 1240  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a la vibración del grupo epóxido (banda de vibración C-O de un éter cíclico) y bandas a 1609, 1509 y 828  $\text{cm}^{-1}$  características de anillos aromáticos sustituidos en polímeros funcionalizados con grupos epóxido.



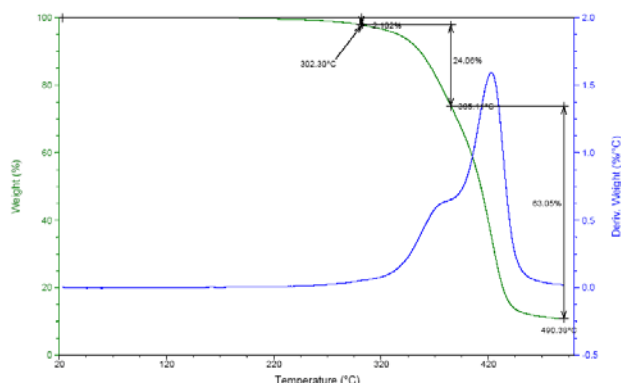
**Figura 102.** Espectro ATR del polímero poli(GE-co-DVB)-4.

## 2. Comportamiento térmico: Análisis termogravimétrico (TGA).

En la Figura 103, se puede observar el análisis termogravimétrico del polímero caracterizado presenta una excelente estabilidad térmica hasta los 220° C, más allá de esta temperatura el material comienza a descomponerse y su pérdida de peso se hace evidente. Se



observan dos etapas principales de pérdida de peso, la primera, a una temperatura de 302°C, corresponde a la liberación de grupos glicidiloxi, mientras que la segunda, a una temperatura de 365°C, corresponde a la liberación de productos aromáticos.



**Figura 103.** Análisis termogravimétrico del polímero poli (*p*-glicidiloxi estireno-*co*-DVB)-4.

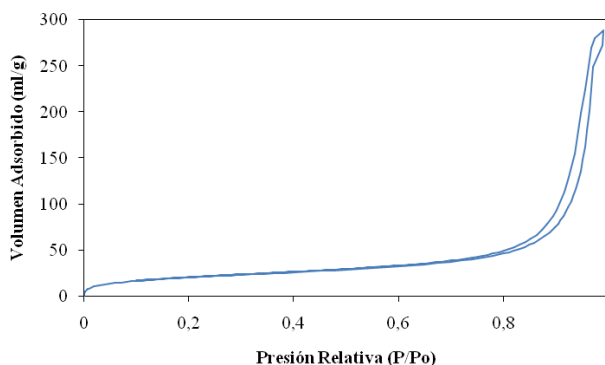
### 3. Caracterización textural.

Con las técnicas de adsorción-desorción de nitrógeno (empleando el método BJH <sup>507, 508</sup>) y microscopía electrónica de barrido se determinaron las propiedades texturales de los polímeros sintetizados.

#### a) Isotherma de adsorción-desorción de nitrógeno.

La isoterma de adsorción-desorción de nitrógeno de este polímero es de tipo IV según la clasificación BET, <sup>506</sup> anteriormente mencionada, en la que se observa un ciclo de histéresis perteneciente al tipo H1, que se ha descrito en morfologías que tienen distribuciones de poro muy angostas o aglomerados de partículas esféricas de tamaños y distribuciones aproximadamente uniformes (Figura 104).

Las ramas de adsorción y desorción de la isoterma son paralelas y llegan a unirse aproximadamente en el punto donde comienza la zona intermedia lineal ( $P/P_0$ : 0.73  $\rightarrow$  Radio de poro mesoporoso: 31.2 nm), presentando un pequeño ciclo de histéresis. Estos fenómenos de histéresis que aparecen en la zona de desorción de la multicapa están asociados a la condensación capilar en estructuras mesoporosas.



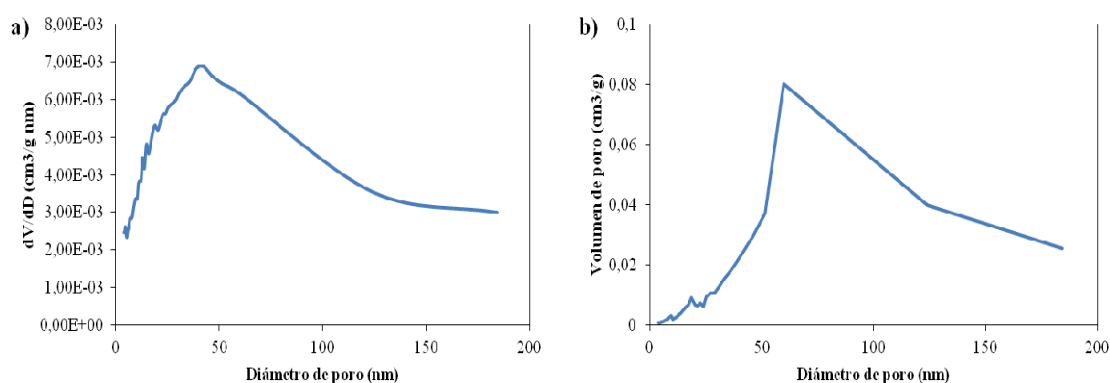
**Figura 104.** Isotherma de adsorción de nitrógeno del polímero poli (GE-*co*-DVB)-4.

### b) Distribución de poro.

En la Figura 105 se presenta la distribución de poro y en la Tabla 85 se representa la distribución del volumen de poro de este polímero. Como se puede observar que el polímero es mayoritariamente mesoporoso, presentando grandes mesoporos.

**Tabla 85.** Distribución del volumen de poro agrupando los poros por grupos de tamaño.

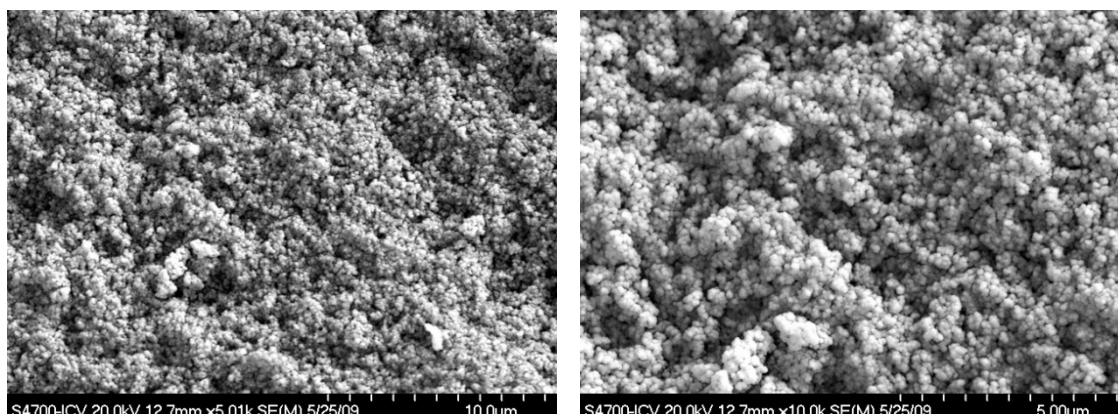
Diámetro (nm)	< 5	5-10	10-15	15-20	20-30	30-50	50-100	>100
Distribución del volumen de poro (%vol.)	2,47	3,29	5,08	6,60	11,68	28,30	30,46	12,14



**Figura 105.** Distribución de tamaño de poro determinado a partir de los datos de adsorción empleando el método BJH.<sup>507, 508</sup> a) Distribución del tamaño de poro. b) Distribución del volumen de poro.

### c) Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

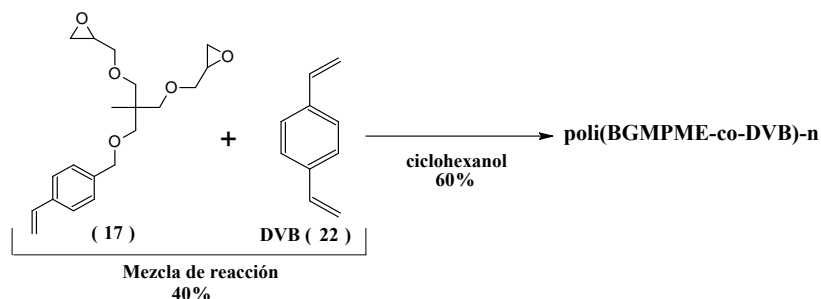
En la Figura 106 se muestran las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido del polímero poli(GE-co-DVB)-4. La morfología encontrada es típica de agregados de partículas, con poros interconectados formados en el espacio interparticular.



**Figura 106.** Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido.

### 5.3.4.2.A. Síntesis, superficie específica y porosidad de polímeros de *p*-{2,2-bis[(glicidilo)metil]propanoxi}metil}estireno (BGMPME) (17) y DVB(22): poli (BGMPME-*co*-DVB)-*n*.

A continuación se analizan las polimerizaciones llevadas a cabo con el ariloxirano funcionalizado con dos grupos epóxido BGMPE (17) y DVB (22) (Esquema 62).



**Esquema 62.** Síntesis de poli(BGMPME-*co*-DVB)-*n*.

En este caso, también se obtienen los mejores resultados empleando bajos porcentajes de AIBN (1%-5%) y una temperatura de 70°C, como puede verse en la Tabla 86.

**Tabla 86.** Síntesis y propiedades texturales de poli(BGMPME-*co*-DVB)-*n* (*n*= 1-6).

Entrada ( <i>n</i> )	Mezcla de reacción		% iniciador	T <sup>a</sup> (°C)	Rto. (%)	Volumen de poro (cm <sup>3</sup> /g)	Tamaño de poro (nm)	Superficie BET (m <sup>2</sup> /g)	R
	% BGMPME	% DVB con estabilizante							
1	75	25	1% AIBN	70	94,9	-	-	-	-
2	75	25	5% AIBN	70	95,2	-	-	-	-
3	60	40	1% AIBN	70	86,5	0,10	30,3	10,1	3,00
4	60	40	5% AIBN	70	95,0	0,33	19,8	69,7	0,28
5	50	50	1% AIBN	70	90,6	0,33	21,6	64,0	0,34
6	50	50	5% AIBN	70	92,3	0,67	14,2	200,4	0,07

%: Corresponde al porcentaje en peso.

Rto.: Rendimiento de la polimerización.

R: Relación tamaño de poro / superficie específica.

- : Polímeros con una superficie específica menor a 1 m<sup>2</sup>/g.

Dado que en las polimerizaciones llevadas a cabo con el monómero anterior (16), se obtuvieron los mejores resultados empleando una mezcla de reacción compuesta por un 75% de monómero y un 25% de crosslinker, empezamos probando estas condiciones para el nuevo monómero (17). En este caso, estas condiciones dieron lugar a polímeros no porosos, con una superficie específica menor a 1 m<sup>2</sup> / g.

De los polímeros sintetizados con el monómero (17), el que presenta mejores propiedades texturales es la entrada *n*= 5, empleando una mezcla de reacción de 50% de monómero y 50% de crosslinker a 70°C con un 1% de AIBN, por lo que el poli(BGMPME-*co*-DVB)-5, es el polímero seleccionado para llevar a cabo las pruebas de inmovilización de enzimas. A continuación se expone un estudio de reproducibilidad del método de polimerización y una caracterización más detallada de este polímero.

- **Estudio de reproducibilidad del método de polimerización.**

El estudio de reproducibilidad se llevó a cabo realizando 5 polimerizaciones en días diferentes, bajo las mismas condiciones, obteniéndose una elevada reproducibilidad del método de polimerización. En la Tabla 87 se muestran los resultados obtenidos en este estudio.

**Tabla 87.** Resultados obtenidos en el estudio de reproducibilidad de la técnica de polimerización.

Polimerización	Rto. (%)	Volumen de poro (cm <sup>3</sup> /g)	Tamaño de poro (nm)	Superficie BET (m <sup>2</sup> /g)
1 <sup>a</sup>	90,6	0,33	21,6	64,0
2 <sup>a</sup>	93,0	0,47	20,9	78,3
3 <sup>a</sup>	89,2	0,31	22,3	65,2
4 <sup>a</sup>	87,9	0,29	23,2	60,1
5 <sup>a</sup>	92,1	0,43	20,1	77,6
Desviación estándar	1,9	0,07	1,1	7,5

Rto.: Rendimiento de la polimerización.

### 5.3.4.2.B. Caracterización de poli (BGMPME-co-DVB)-5.

#### 1. Análisis y caracterización de los grupos epóxido.

##### a) Análisis elemental.

Poli(BGMPME-co-DVB)-5 C:80.80% H: 8.12% O:11.08%

##### b) Determinación del grado de epoxidación del polímero.

Como se observa en la Tabla 88, los resultados de la valoración de los grupos epóxido y del análisis elemental concuerdan con el margen teórico obtenido teniendo en cuenta la mezcla y el rendimiento de la polimerización.

**Tabla 88.** Grado de epoxidación de poli(BGMPME-co-DVB)-5.

Polímero	Grado de epoxidación (mmol epóxido/g de polímero)		
	Teórico <sup>a</sup>	Análisis elemental	Valoración <sup>b</sup>
Poli(BGMPME-co-DVB)-5	2.87-2.30	2.80	2.90

<sup>a</sup> Calculado teniendo en cuenta la mezcla de reacción y el rendimiento de la polimerización.

<sup>b</sup> Tritiación con bromuro de tetraetil amonio y ácido perclórico en presencia de cristal violeta.

##### c) Caracterización de los grupos epóxido mediante espectroscopia de infrarrojo (ATR/FT-IR).

En la Figura 107 se muestra el espectro obtenido mediante ATR del polímero caracterizado. En el espectro se pueden observar las señales características de polímeros funcionalizados con grupos epóxido: una banda a 907 cm<sup>-1</sup> característica de la absorción por grupos epóxido, una banda a 1254 cm<sup>-1</sup> correspondiente a la vibración del grupo epóxido (banda

de vibración C-O-C de un éter cíclico) y bandas a 1603, 1510 y 839  $\text{cm}^{-1}$  características de anillos aromáticos sustituidos en polímeros funcionalizados con grupos epóxido.

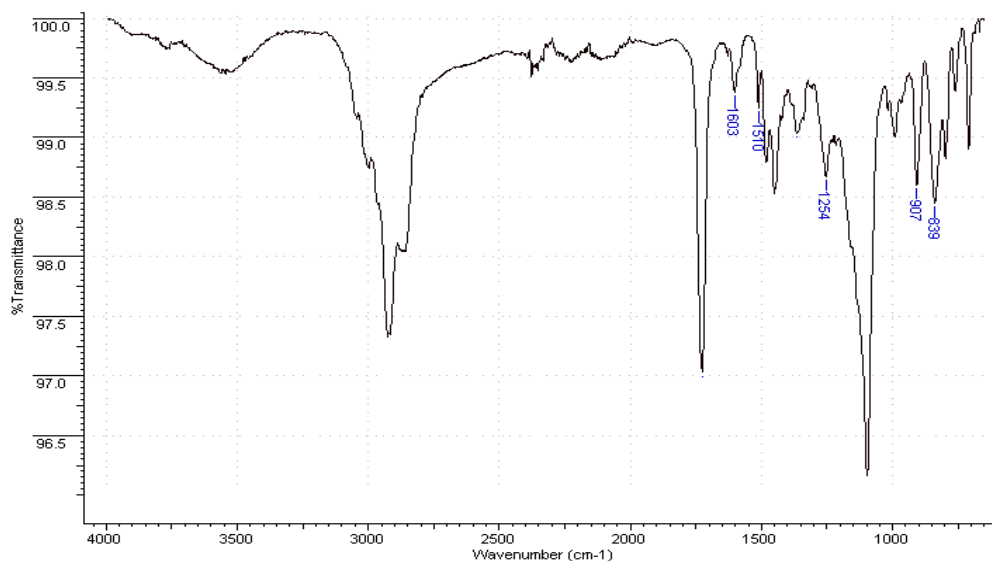


Figura 107. Espectro ATR del polímero poli (BGMPME-co-DVB)-5.

## 2. Comportamiento térmico: Análisis termogravimétrico (TGA).

En la Figura 108, se puede observar el análisis termogravimétrico del polímero caracterizado presenta una excelente estabilidad térmica hasta los 200° C, más allá de esta temperatura el material comienza a descomponerse y su pérdida de peso se hace evidente. Se observan dos etapas principales de pérdida de peso, la primera, a una temperatura de 250°C, corresponde a la liberación de grupos 2,2-bis [(glicidiloxi) metil] propanoxi, mientras que la segunda, a una temperatura de 378°C, corresponde a la liberación de productos aromáticos.

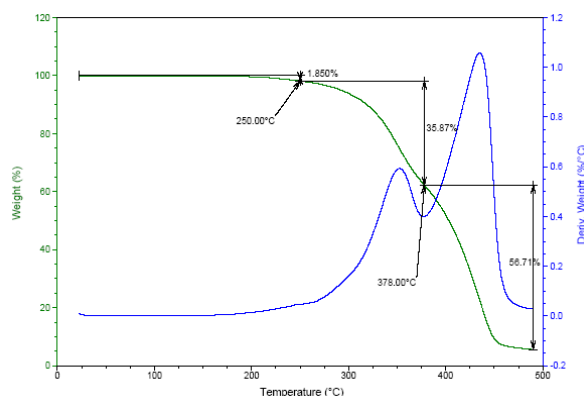


Figura 108. Análisis termogravimétrico del polímero poli(BGMPME-co-DVB)-5.

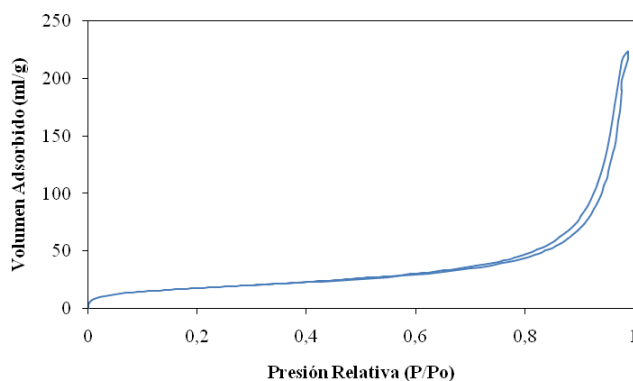
## 3. Caracterización textural.

Con las técnicas de adsorción-desorción de nitrógeno (empleando el método BJH<sup>507, 508</sup>) y microscopía electrónica de barrido se determinaron las propiedades texturales de los polímeros sintetizados.

### a) Isotherma de adsorción-desorción de nitrógeno.

La isoterma de adsorción-desorción de nitrógeno de este polímero es de tipo IV según la clasificación BET,<sup>506</sup> anteriormente mencionada, en la que se observa un ciclo de histéresis perteneciente al tipo H1, que se ha descrito en morfologías que tienen distribuciones de poro muy angostas o aglomerados de partículas esféricas de tamaños y distribuciones aproximadamente uniformes (Figura 109).

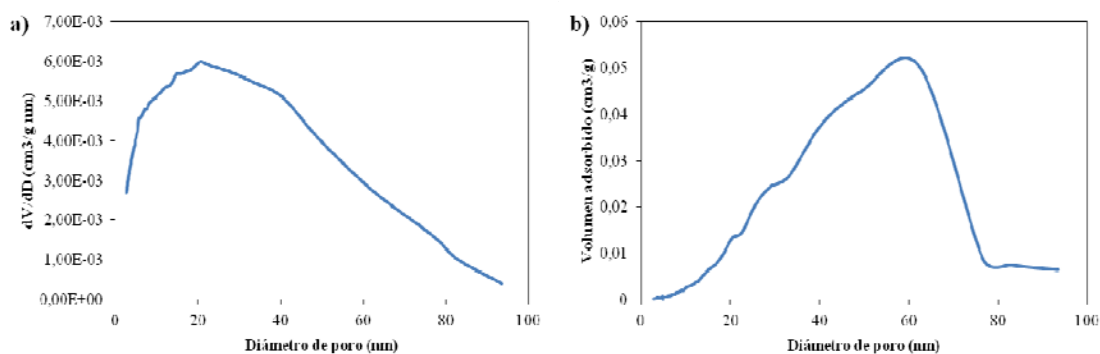
Las ramas de adsorción y desorción de la isoterma son paralelas y llegan a unirse aproximadamente en el punto donde comienza la zona intermedia lineal ( $P/P_0$ : 0.70  $\rightarrow$  Radio de poro mesoporoso: 27.6 nm), presentando un pequeño ciclo de histéresis. Estos fenómenos de histéresis que aparecen en la zona de desorción de la multicapa están asociados a la condensación capilar en estructuras mesoporosas.



**Figura 109.** Isotherma de adsorción de nitrógeno del polímero poli(BGMPME-co-DVB)-5.

### b) Distribución de poro.

En la Figura 110 se presenta la distribución de poro y en la Tabla 89 se representa la distribución del volumen de poro de este polímero. Como se puede observar el polímero es mayoritariamente mesoporoso y la presencia de mesoporos de gran tamaño contribuye significativamente al volumen de poro del soporte.



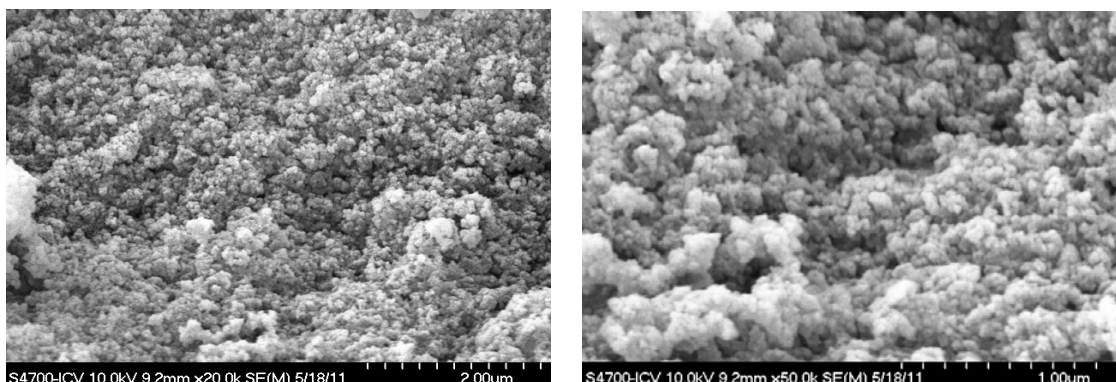
**Figura 110.** Distribución de tamaño de poro determinado a partir de los datos de adsorción empleando el método BJH.<sup>507, 508</sup> a) Distribución del tamaño de poro. b) Distribución del volumen de poro.

**Tabla 89.** Distribución del volumen de poro agrupando los poros por grupos de tamaño.

Diámetro (nm)	< 5	5-10	10-15	15-20	20-30	30-50	50-100	>100
Distribución del volumen de poro (%vol.)	3,75	5,44	6,57	6,87	11,19	21,74	34,54	9,89

### c) Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

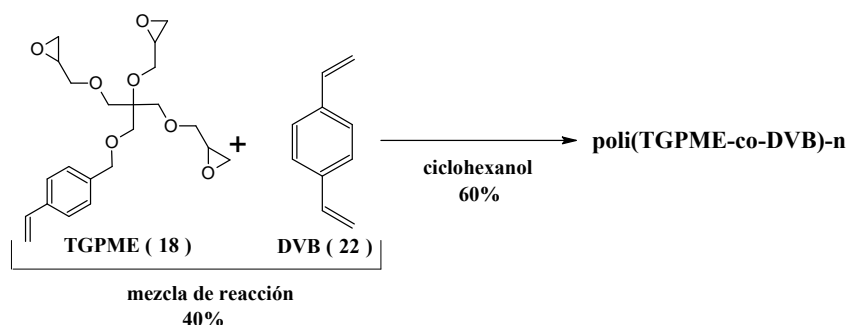
En la Figura 111 se muestran las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido del polímero poli(BGMPME-*co*-DVB)-5. La morfología encontrada es típica de agregados de partículas, con poros interconectados formados en el espacio interparticular.



**Figura 111.** Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido.

#### 5.3.4.3.A. Síntesis, superficie específica y porosidad de los polímeros de *p*-[(triglicidilpentaeritroxi)metil] estireno (TGPME) (18) y DVB (22): poli(TGPME-*co*-DVB)-n.

Finalmente, se llevaron a cabo las polimerizaciones con el monómero funcionalizado con tres grupos epóxido, el *p*-[(triglicidil pentaeritroxi)metil]estireno (TGPME) (18) (Esquema 63).



**Esquema 63.** Síntesis de poli(TGPME-*co*-DVB)-n.

Como en los casos anteriores, también se obtienen elevados rendimientos en las polimerizaciones a 70°C empleando un bajo porcentaje de AIBN (1%-5%). Como sucedió con el monómero anterior (17), mezclas de reacción con un 75% de monómero, dieron lugar a

polímeros no porosos, con una superficie específica inferior a  $1 \text{ m}^2 / \text{g}$ . Los resultados obtenidos en estas polimerizaciones aparecen reflejados en la Tabla 90.

Como se observa en la Tabla 90, los mejores resultados obtenidos, corresponden a las entradas  $n=3$  y  $4$ . Al final, seleccionamos para llevar a cabo las pruebas de inmovilización de enzimas el poli (TGMPE-co-DVB)-3, ya que es el que presenta mayor tamaño de poro. A continuación se expone un estudio de reproducibilidad de la técnica de polimerización y una caracterización más detallada de este polímero.

**Tabla 90.** Síntesis y propiedades texturales de poli (TGPME-co-DVB)-n. ( $n=1-8$ ).

Entrada (n)	Mezcla de reacción		% iniciador	T <sup>a</sup> (°C)	Rto. (%)	Volumen de poro (cm <sup>3</sup> /g)	Tamaño de poro (nm)	Superficie BET (m <sup>2</sup> /g)	R
	% TGMPE	% DVB con estabilizante							
1	75	25	1% AIBN	70	93,1	-	-	-	-
2	75	25	5% AIBN	70	96,9	-	-	-	-
3	60	40	1% AIBN	70	97,1	0,20	22,9	39,4	0,58
4	60	40	5% AIBN	70	97,4	0,43	19,0	94,0	0,20
5	50	50	1% AIBN	70	93,0	0,56	17,0	136,6	0,12
6	50	50	5% AIBN	70	96,6	0,61	15,1	169,6	0,09
7	40	60	1% AIBN	70	93,8	0,68	14,1	204,2	0,07
8	40	60	5% AIBN	70	96,6	0,87	14,9	246,8	0,06

%: Representa el porcentaje en peso.

Rto.: Rendimiento de la polimerización.

R: Relación tamaño de poro/superficie específica.

- : Polímeros con una superficie específica menor a  $1 \text{ m}^2/\text{g}$ .

- **Estudio de reproducibilidad del método de polimerización.**

El estudio de reproducibilidad se llevó a cabo realizando 5 polimerizaciones en días diferentes, bajo las mismas condiciones, obteniéndose una elevada reproducibilidad del método de polimerización. En la Tabla 91 se muestran los resultados obtenidos en este estudio.

**Tabla 91.** Resultados obtenidos en el estudio de reproducibilidad de la técnica de polimerización.

Polimerización	Rto. (%)	Volumen de poro (cm <sup>3</sup> /g)	Tamaño de poro (nm)	Superficie BET (m <sup>2</sup> /g)
1 <sup>a</sup>	97,1	0,2	22,9	39,4
2 <sup>a</sup>	97,3	0,31	21,1	50,6
3 <sup>a</sup>	96,9	0,26	22,2	41,3
4 <sup>a</sup>	95,8	0,18	23,9	35,9
5 <sup>a</sup>	97,4	0,39	20,1	53,2
Desviación estándar	0,6	0,08	1,3	6,7

Rto.: Rendimiento de la polimerización.

%: Representa el porcentaje en peso.



### 5.3.4.3.B. Caracterización de poli(TGPME-co-DVB)-3.

#### 1. Análisis y caracterización de grupos epóxido.

##### a) Análisis elemental.

Poli(TGPME-co-DVB)-3 C: 77.00% H: 7.74% O:15.26%

##### b) Determinación del grado de epoxidación del polímero.

Como se observa en la Tabla 92, los resultados de la valoración de los grupos epóxido y del análisis elemental concuerdan con el margen teórico obtenido teniendo en cuenta la mezcla y el rendimiento de la polimerización.

**Tabla 92.** Grado de epoxidación de poli(TGPME-co-DVB)-3.

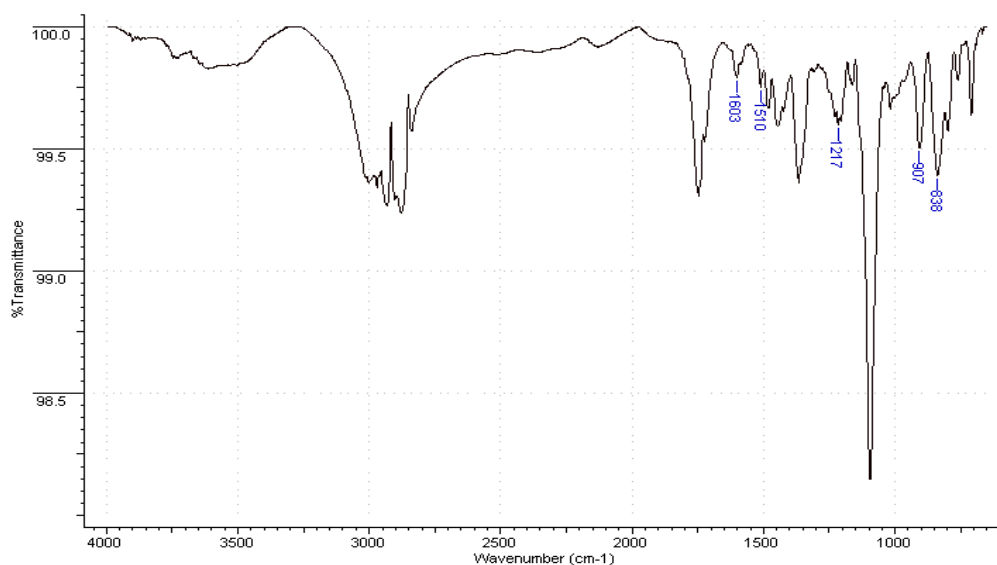
Polímero	Grado de epoxidación (mmol epóxido/g de polímero)		
	Teórico <sup>a</sup>	Análisis elemental	Valoración <sup>b</sup>
<b>Poli(TGPME-co-DVB)-3</b>	4.3-4.07	4.10	4.03

<sup>a</sup> Calculado teniendo en cuenta la mezcla de reacción y el rendimiento de la polimerización.

<sup>b</sup> Titración con bromuro de tetraetil amonio y ácido perclórico en presencia de cristal violeta.

##### c) Caracterización de los grupos epóxido mediante espectroscopia de infrarrojo (ATR/FT-IR).

En la Figura 112 se muestra el espectro obtenido mediante ATR del polímero caracterizado. En el espectro se pueden observar las señales características de polímeros funcionalizados con grupos epóxido: una banda a 907  $\text{cm}^{-1}$  característica de la absorción por grupos epóxido, una banda a 1217  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a la vibración del grupo epóxido (banda de vibración C-O de un éter cíclico) y bandas a 1603, 1510 y 838  $\text{cm}^{-1}$  características de anillos aromáticos sustituidos en polímeros funcionalizados con grupos epóxido.



**Figura 112.** Espectro ATR del polímero poli (TGPME-co-DVB)-3.

## 2. Comportamiento térmico: Análisis termogravimétrico (TGA).

En la Figura 113, se puede observar el análisis termogravimétrico del polímero caracterizado presenta una excelente estabilidad térmica hasta los 220° C, más allá de esta temperatura el material comienza a descomponerse y su pérdida de peso se hace evidente. Se observan dos etapas principales de pérdida de peso, la primera, a una temperatura de 310°C, corresponde a la liberación de grupos triglicidil pentaeritroxi, mientras que la segunda, a una temperatura de 405°C, corresponde a la liberación de productos aromáticos.

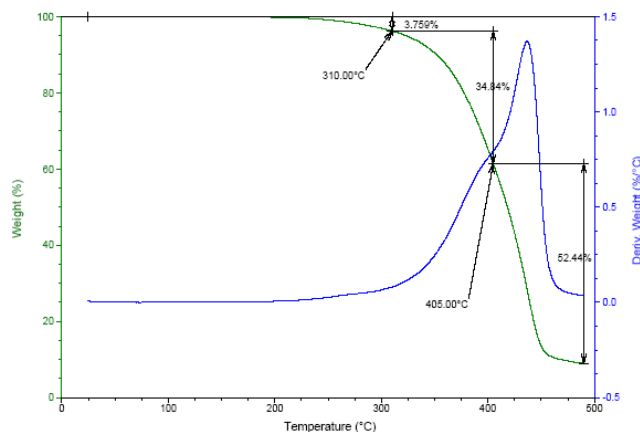


Figura 113. Análisis termogravimétrico del polímero poli(TGPME-co-DVB)-3.

## 3. Caracterización textural.

Con las técnicas de adsorción-desorción de nitrógeno (empleando el método BJH<sup>507, 508</sup>) y microscopía electrónica de barrido se determinaron las propiedades texturales de los polímeros sintetizados.

### a) Isotherma de adsorción-desorción de nitrógeno.

La isoterma de adsorción-desorción de nitrógeno de este polímero es de tipo IV según la clasificación BET<sup>506</sup> anteriormente mencionada, en la que se observa un ciclo de histéresis perteneciente al tipo H1, que se ha descrito en morfologías que tienen distribuciones de poro muy angostas o aglomerados de partículas esféricas de tamaños y distribuciones aproximadamente uniformes (Figura 114).

Las ramas de adsorción y desorción de la isoterma no son paralelas (debido a fenómenos de cavitación) y llegan a unirse aproximadamente en el punto donde comienza la zona intermedia lineal (P/Po: 0.4 → Radio de poro mesoporoso: 11 nm), presentando un pequeño ciclo de histéresis. Estos fenómenos de histéresis que aparecen en la zona de desorción de la multicapa están asociados a la condensación capilar en estructuras mesoporosas.

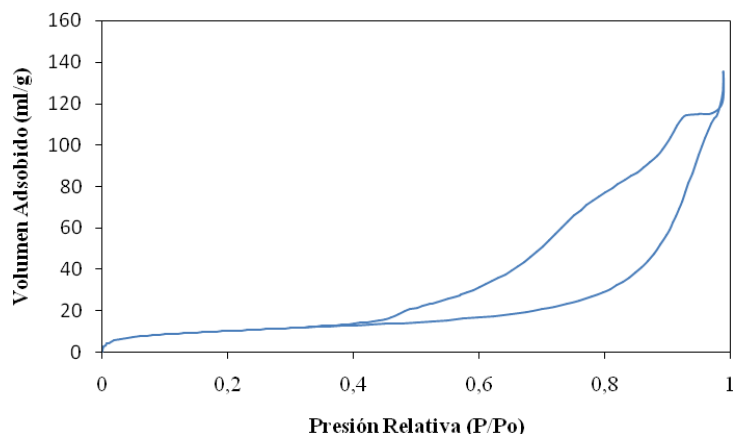


Figura 114. Isotherma de adsorción de nitrógeno del polímero poli(TGPME-co-DVB)-3.

**b) Distribución de poro.**

En la Figura 115 se presenta la distribución de poro y en la Tabla 93 se representa la distribución del volumen de poro de este polímero. Como se puede observar este polímero es mayoritariamente mesoporoso.

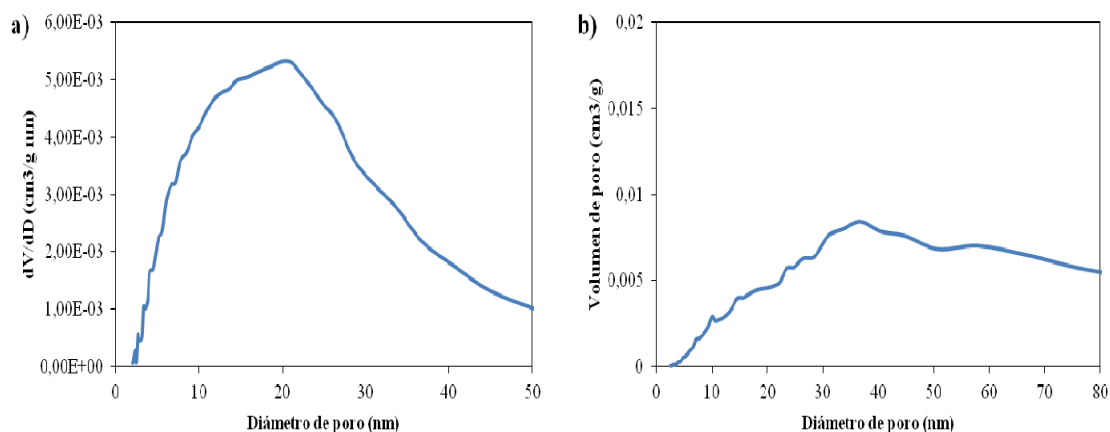


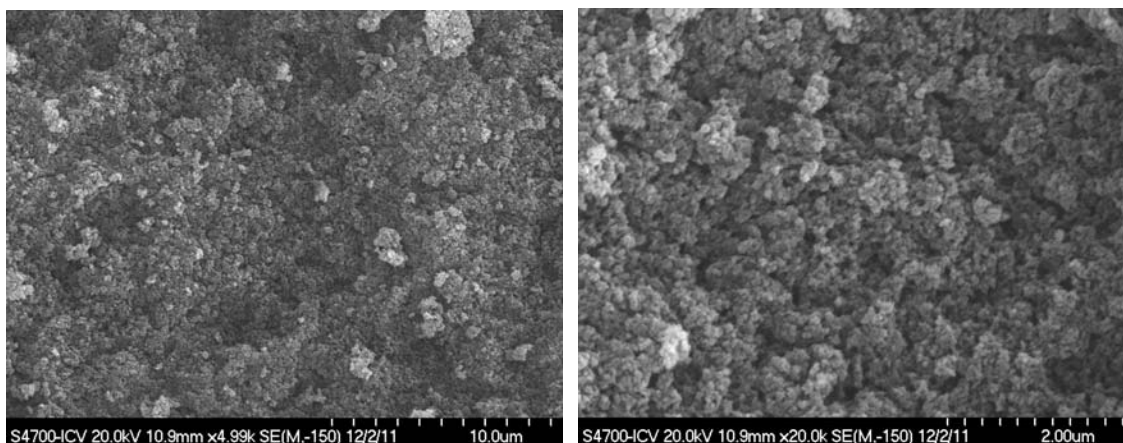
Figura 115. Distribución de poro determinado a partir de los datos de adsorción empleando el método BJH.<sup>507, 508</sup> a) Distribución del tamaño de poro. b) Distribución del volumen de poro.

Tabla 93. Distribución del volumen de poro agrupando los poros por grupos de tamaño.

Diámetro (nm)	< 5	5-10	10-15	15-20	20-30	30-50	50-100	>100
Distribución del volumen de poro (%vol.)	1,53	7,88	12,68	11,00	21,93	18,72	9,58	16,67

### c) Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

En la Figura 116 se muestran las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido del polímero poli(TGPME-*co*-DVB)-3. La morfología encontrada es típica de agregados de partículas, con poros interconectados formados en el espacio interparticular.



**Figura 116.** Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido.

#### 5.3.4.4. Resumen comparativo de las polimerizaciones de ariloxiranos con agente de entrecruzamiento arílico.

- a) El monómero que origina los polímeros con mejores propiedades texturales es el *p*-glicidiloxi estireno (GE).
- b) Los porcentajes relativos de monómero y agente de entrecruzamiento que dan lugar a los mejores resultados varían con el empleo de los distintos monómeros.
- c) El porcentaje de iniciador radicalario que da lugar a mejores resultado varía dependiendo el monómero empleado entre 1 y 5%.
- d) El rendimiento obtenido en las polimerizaciones mejora al aumentar el porcentaje de iniciador radicalario empleado.

#### 5.3.5. Resumen comparativo de los grupos principales de polimerización.

En la Tabla 94 se pueden observar los mejores resultados obtenidos en todos los grupos de polimerización.

**Tabla 94.** Propiedades texturales de los polímeros seleccionados para llevar a cabo las pruebas de inmovilización-estabilización de enzimas

Grupo de polimerización	Polímero	Rto. (%)	Volumen de poro (mL)	Tamaño de poro (nm)	Superficie específica BET (m <sup>2</sup> /g)
<b>Alquilo-xiranos + DVB</b>	Poli(AGE- <i>co</i> -DVB)-74	41,6	0,55	24,9	96,9
	Poli(ADGGE- <i>co</i> -DVB)-50	41,5	1,58	26,1	242,1
	Poli(ATGPE- <i>co</i> -DVB)-13	54,7	1,22	24,2	207,7
<b>Alquilo-xiranos + DAPE + DVB</b>	Poli(AGE- <i>co</i> -DAPE-DVB)-4	33,7	1,60	19,9	333,1
	Poli(ADGGE- <i>co</i> -DAPE-DVB)-10	38,2	0,86	18,9	191,0
	Poli(ATGPE- <i>co</i> -DAPE-DVB)-6	36,8	1,47	21,8	280,4
<b>Metacriloxiranos + EGDMA ó HDDMA</b>	Poli(GMA- <i>co</i> -EGDMA)-11	96,7	0,28	25,4	45,4
	Poli(GMA- <i>co</i> -HDDMA)-2	91,9	0,15	26,4	27,0
	Poli(BGMPMA- <i>co</i> -EGDMA)-8	84,2	0,33	30,4	44,8
	Poli(TGPMA- <i>co</i> -EGDMA)-9	86,5	0,29	26,8	44,1
<b>Metacriloxiranos + HEMA + EGDMA</b>	Poli(GMA-HEMA- <i>co</i> -EGDMA)-9	96,0	0,27	27,1	33,8
	Poli(BGMPMA-HEMA- <i>co</i> -EGDMA)-2	98,3	0,13	24,9	21,5
	Poli(TGPMA-HEMA- <i>co</i> -EGDMA)-1	86,0	0,20	24,8	33,1
<b>Metacriloxiranos + DEAEMA + EGDMA</b>	Poli(GMA-DEAEMA- <i>co</i> -EGDMA)-1	84,3	0,29	31,4	37,8
	Poli(BGMPMA-DEAEMA- <i>co</i> -EGDMA)-1	94,2	0,09	21,9	17,2
	Poli(TGPMA-DEAEMA- <i>co</i> -EGDMA)-1	96,1	0,09	23,2	16,8
<b>Metacriloxiranos + HEMA + DEAEMA + EGDMA</b>	Poli(GMA-HEMA-DEAEMA- <i>co</i> -EGDMA)-9	95,8	0,34	27,6	51,2
	Poli(BGMPMA-HEMA-DEAEMA- <i>co</i> -EGDMA)-2	93,8	0,02	30,6	2,6
	Poli(TGPMA-HEMA-DEAEMA- <i>co</i> -EGDMA)-1	93,7	0,29	22,6	53,4
<b>Ariloxiranos + DVB</b>	Poli(GE- <i>co</i> -DVB)-4	94,3	0,43	24,1	73,9
	Poli(BGMPME- <i>co</i> -DVB)-5	90,6	0,33	21,6	64,0
	Poli(TGPME- <i>co</i> -DVB)-3	97,1	0,20	22,9	39,4

Analizando la Tabla 94 se puede observar que:

- a) El grupo de polimerización que da lugar a los polímeros con mejores propiedades texturales es el resultante de polimerizar los monómeros alquioxiranos con un agente de entrecruzamiento arílico (DVB) (tamaño de poro: 24-26 nm y superficie específica: 100-240 m<sup>2</sup> / g), sin embargo, los rendimientos de reacción obtenidos son bajos (41-55%). A continuación estarían los polímeros originados a partir de monómeros ariloxiranos, metacriloalquioxiranos, y por último los resultantes de polimerizar los monómeros alquioxiranos con una mezcla de agentes de entrecruzamiento, alquílico (DAPE) y arílico (DVB).
- b) La introducción de un agente de entrecruzamiento alquílico (DAPE) en el grupo de polimerización de monómeros alquílicos con DVB, con el objetivo de aumentar la hidrofiliidad de dichos polímeros, origina peores rendimientos de reacción (34-38%) y polímeros con menor tamaño de poro (19-22 nm) y mayor superficie específica (190-330 m<sup>2</sup> / g).
- c) El grupo de polimerización resultante de polimerizar los monómeros metacriloalquioxiranos con agentes de entrecruzamiento metacrílico origina polímeros con mayor tamaño de poro (25-30 nm) y menor superficie específica (27-45 m<sup>2</sup> / g) que el mejor grupo. Sin embargo, da lugar a excelentes rendimientos de reacción (84-97%).
- d) La introducción de un monómero metacrílico funcionalizado con un grupo hidroxilo en el grupo de polimerización de monómeros metacrílicos, con el objetivo de aumentar la hidrofiliidad de dichos polímeros, da lugar a polímeros con menor tamaño poro (25-27 nm) y menor superficie específica (22-34 m<sup>2</sup> / g).
- e) La introducción de un monómero metacrílico funcionalizado con un grupo amino en el grupo de polimerización de monómeros metacrílicos, con el objetivo de aumentar la capacidad de intercambio iónico de dichos polímeros, da lugar generalmente a polímeros con menor tamaño poro (22-31 nm) y menor superficie específica (17-38 m<sup>2</sup> / g).
- f) La introducción de monómeros metacrílicos, funcionalizados con un grupo hidroxilo y un grupo amino, en el grupo de polimerización de monómeros metacrílicos, da lugar generalmente a polímeros con mayor tamaño poro (23-31 nm) y mayor superficie específica (51-53 m<sup>2</sup> / g).
- g) El grupo de polimerización resultante de polimerizar los monómeros ariloxiranos con un agente de entrecruzamiento arílico (DVB) da lugar a polímeros con menor tamaño de poro (22-24 nm) y menor superficie específica (39-74 m<sup>2</sup> / g) que el mejor grupo, sin embargo, origina excelentes rendimientos de reacción (91-97%).

## 5.4. Inmovilización-estabilización de enzimas.

### 5.4.1. Inmovilización-estabilización de Glicosidasas.

#### 5.4.1.1. Inmovilización-estabilización de $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans* (Biolacta).

##### 5.4.1.1.1. Caracterización de $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans* (Biolacta).

El empleo de enzimas con fines sintéticos requiere un conocimiento exhaustivo de las características del biocatalizador, en cuanto a la cantidad de proteínas que contiene y a la actividad enzimática del mismo.

Se determinó la cantidad de proteína del preparado enzimático comercial y la actividad enzimática siguiendo la metodología del procedimiento general descrito en el apartado 6.3.1.1.1 de la parte experimental. Las medidas de actividades se realizaron con disoluciones 2 mM de *p*-nitrofenil- $\beta$ -galactopiranosido (PNF- $\beta$ -gal), en tampón tris/HCl 10mM pH 7.3 a 37°C.

La cantidad de enzima observada en el preparado enzimático comercial ( $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans*, BIOLACTA N°5) fue de 10 % y la actividad enzimática de 3.5 U / mg proteína, estos valores son similares a los descritos por otros autores en la bibliografía<sup>211,212, 531</sup> para el mismo preparado.

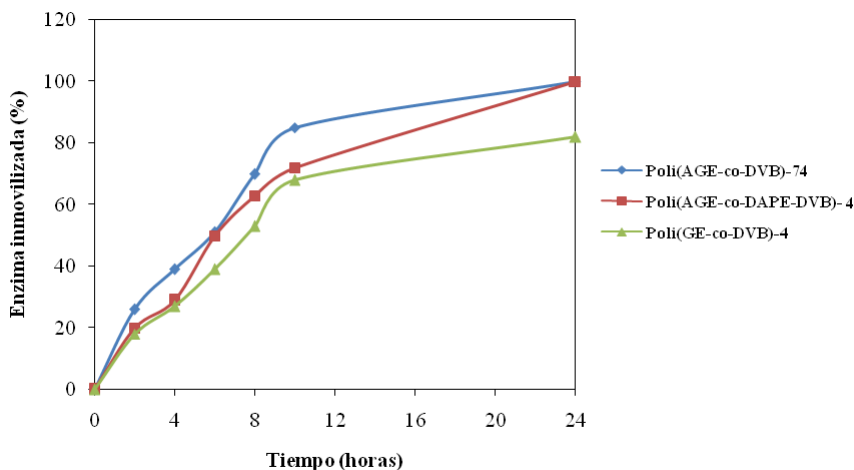
##### 5.4.1.1.2. Inmovilización-estabilización de $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans* (Biolacta).

El proceso de inmovilización se llevó a cabo utilizando el preparado comercial de la  $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans* (BIOLACTA N°5) y tres de los polímeros sintetizados en esta memoria de investigación (cuando se llevó a cabo esta inmovilización, solo teníamos caracterizados los polímeros pertenecientes a los grupos de polimerización empleados en este estudio, es decir los poli(AGE-*co*-DVB), poli(AGE-*co*-DAPE-DVB) y poli(*p*-glicidiloxi estireno-*co*-DVB). A posteriori, la idea era repetir esta inmovilización con el resto de polímeros, pero no se pudo llevar a cabo debido a que la empresa que produce la enzima, la ha dejado de comercializar). La selección de estos polímeros se realizó teniendo en cuenta sus propiedades texturales, siendo seleccionados para el proceso de selección, poli(AGE-*co*-DVB)-74, poli(AGE-*co*-DAPE-DVB)-4 y poli(*p*-glicidiloxi estireno-*co*-DVB)-4, debido a que eran los polímeros de cada grupo de polimerización que poseían el mayor tamaño de poro posible manteniendo una elevada superficie específica.

El proceso de inmovilización se siguió midiendo la cantidad de proteína inmovilizada a lo largo del tiempo, para ello se utilizó la metodología del procedimiento general descrito en el apartado 6.3.1.1.2 de la parte experimental.

Los resultados obtenidos en cuanto a la evolución del proceso de anclaje de la enzima a los soportes seleccionados a lo largo del tiempo aparecen representados en la Figura 117.

Como se puede observar en la Figura 117, en el caso de los polímeros poli(AGE-co-DVB)-74 y poli(AGE-co-DAPE-DVB)-4 a las 6 horas se consigue el 50% de la inmovilización de la enzima y a las 24 horas se obtiene el 100 %. En el caso del polímero poli(*p*-glicidiloxi estireno-co-DVB)-4 el 50 % de la inmovilización se consigue a las 7 horas y a las 24 horas se obtiene el 80 %. Estos valores son similares a los descritos por Hernáiz y colaboradores,<sup>212</sup> con la misma enzima empleando un soporte comercial, el Eupergit C.



**Figura 117.** Evolución del anclaje enzimático durante el proceso de inmovilización de la  $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans* en los polímeros seleccionados.

En este proceso de inmovilización, no se llevo a cabo una optimización de la carga enzimática de los soportes, ya que se emplearon las proporciones enzima/soporte, descritas por Hernáiz y col.,<sup>212</sup> que daban lugar a los mejores resultados, empleando la misma enzima y un soporte comerciales similar a los sintetizados en este trabajo (relación 1/2 (w/w), preparado enzimático comercial/soporte).

#### 5.4.1.1.3. Caracterización de los derivados inmovilizados de $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans* (Biolacta).

Una vez finalizado el proceso de inmovilización se determino la actividad enzimática de los derivados inmovilizados siguiendo la metodología del procedimiento general descrito en el apartado 6.3.1.1.3 de la parte experimental. Las medidas de actividades se realizaron con disoluciones 2 mM de *p*-nitrofenil- $\beta$ -galactopiranosido (PNF- $\beta$ -gal), en tampón tris/HCl 10mM pH 7.3 a 37°C.

Los resultados de la determinación de actividad enzimática observada tras el proceso de inmovilización en los tres polímeros seleccionados, aparecen reflejados en la Tabla 95. En esta Tabla, se presenta además, un estudio comparativo de los polímeros sintetizados con soportes



comerciales que han sido empleados por otros autores<sup>212</sup> para la inmovilización de la enzima  $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans*.

Como se puede observar en la Tabla 95, el polímero poli(AGE-co-DVB)-74 inmoviliza el 100% de enzima empleada y retiene el 82% de la actividad enzimática inicial de la enzima libre, mientras que en el caso de los polímeros poli(AGE-co-DAPE-DVB)-4 y poli(*p*-glicidiloxi estireno-*co*-DVB)-4 inmovilizan respectivamente el 100% y 82% de la enzima empleada y la actividad enzimática retenida disminuye a un 19% y 29% respectivamente. Como podemos observar el derivado inmovilizado obtenido con el polímero poli(AGE-co-DVB)-74 es más activo que los obtenidos por Hernáiz y colaboradores.<sup>212</sup> Los derivados poli(AGE-*co*-DAPE-DVB-31) y poli(*p*-glicidiloxi estireno-*co*-DVB)-4 presentan una actividad enzimática menor que los soportes comerciales (Eupergit C y Eupergit C 250 L) (Tabla 95).<sup>533</sup>

**Tabla 95.** Determinación de actividad enzimática de los derivados inmovilizados de  $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans*. Empleando una relación de Biolacta N°5/soporte 1:2.

Soporte	Volumen de poro (mL)	Tamaño de poro (nm)	Superficie específica BET (m <sup>2</sup> /g)	Grado de epoxidación (mmol/g)	Enzima inmovilizada (%)	Carga enzimática (mg enzima/g soporte)	Actividad enzimática U/mg <sup>a</sup>	(%) <sup>b</sup>
Poli(AGE- <i>co</i> -DVB)-74	0,55	25	97	2,0	100	47,6	2,9	82
Poli(AGE- <i>co</i> -DAPE-DVB)-4	1,60	20	333	0,9	100	47,6	0,7	19
Poli(GE- <i>co</i> -DVB)-4	0,43	24	74	3,2	82	39,0	1,0	29
Eupergit C <sup>c</sup>	0,06 <sup>d</sup>	10 <sup>d</sup>	4,5 <sup>d</sup>	0,6 <sup>d</sup>	100	47,6	2,3	67
Eupergit C 250 L <sup>c</sup>	1,89 <sup>d</sup>	100 <sup>d</sup>	49 <sup>d</sup>	0,3 <sup>d</sup>	90	42,8	1,9	53

<sup>a</sup> Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que hidroliza 1  $\mu$ mol de sustrato en las condiciones citadas en el apartado 6.3.1.1.1 de la parte experimental. La actividad específica está expresada en unidades/mg de enzima (U/mg).

<sup>b</sup> Tasa relativa de hidrólisis de *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido de la enzima inmovilizada respecto a la misma cantidad de enzima nativa. La actividad enzimática de la  $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans* libre fue 3.5 U/mg (100%).

<sup>c</sup> Hernáiz y col.<sup>212</sup>

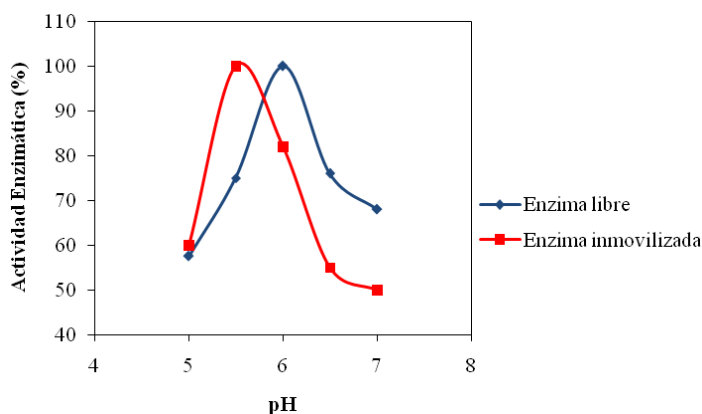
<sup>d</sup> De Segura y col.<sup>532</sup>

Analizando en detalle los datos que aparecen reflejados en la Tabla 95, no se observa ninguna tendencia que relacione la cantidad de enzima inmovilizada y la actividad enzimática retenida con las propiedades texturales de los diversos polímeros empleados en este estudio. Se puede destacar que de los polímeros empleados en este estudio, el polímero que da lugar a los mejores resultados de inmovilización y retención de actividad enzimática, el poli(AGE-*co*-DVB)-74, posee una hidrofilia intermedia respecto a poli(AGE-*co*-DAPE-DVB)-4 (más hidrofílico) y a poli(*p*-glicidiloxi estireno-*co*-DVB)-4 (más hidrofóbico). Por lo que, la hidrofilia del soporte junto con la estructura tridimensional del soporte, parecen ser los factores que condicionan la inmovilización de la  $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans* (Biolacta) y la retención de su actividad enzimática.

Tras el estudio de caracterización de la cantidad de proteína y de la actividad enzimática de los diferentes derivados inmovilizados preparados en este apartado se seleccionó el derivado poli(AGE-co-DVB)-100 por ser el que presentaba una mayor actividad enzimática.

- **Efecto del pH en la actividad catalítica del derivado poli(AGE-co-DVB)-74 .**

Se realizó un estudio de la influencia que tiene el pH en la actividad enzimática de la  $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans*, tanto libre como inmovilizada en el polímero poli(AGE-co-DVB)-74, siguiendo la metodología descrita en el apartado 6.3.1.1.3, con el objeto de seleccionar el pH óptimo para llevar a cabo las síntesis enzimáticas. En la Figura 118 se pueden observar los resultados obtenidos en este estudio. Como se puede ver, el pH óptimo para la enzima inmovilizada (pH 5.5) resultó ser algo menor al de la enzima libre (pH 6.0). Estos resultados coinciden con los resultados obtenidos por Hernáiz y colaboradores,<sup>212</sup> con la misma enzima inmovilizada sobre polímeros comerciales (Eupergit C y Eupergit C 250 L) y presumiblemente de deben a cambios en el pK de residuos funcionales de la enzima.

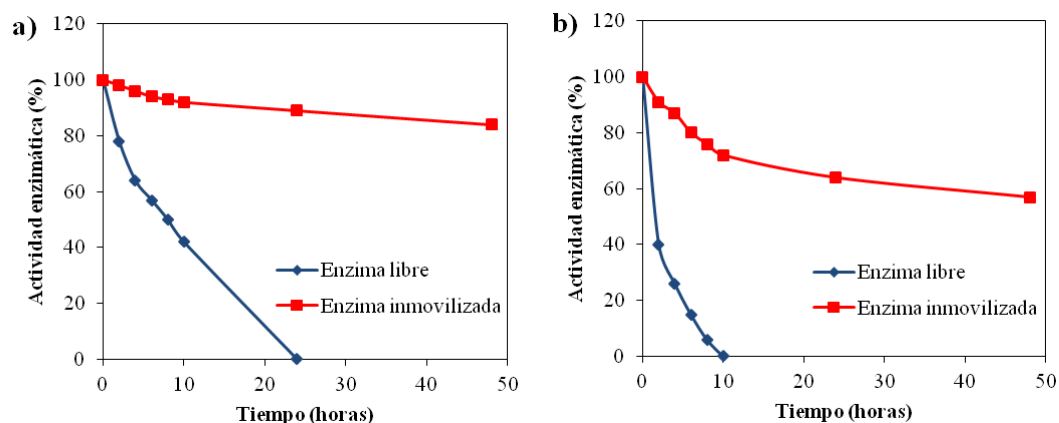


**Figura 118.** Influencia del pH en la actividad enzimática de la  $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans* libre e inmovilizada en el polímero poli(AGE-co-DVB)-74 .

- **Estabilidad térmica del derivado poli (AGE-co-DVB)-74.**

Con el objetivo de verificar la estabilidad que proporciona el proceso de inmovilización a la  $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans*, se llevó a cabo un estudio de termo estabilidad de la enzima libre e inmovilizada a dos temperaturas, 37 °C (Figura 119, a) y 50 °C (Figura 119, b), siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.3.1.1.3. Como se puede observar en la Figura 119-a, el enzima libre pierde el 50 % de su actividad a las 8 horas y el 100 % a las 24 horas. Por el contrario el derivado inmovilizado mantiene el 89 % de su actividad a las 24 horas. A 50 °C (Figura 119, b) el comportamiento es similar, en este caso el enzima libre pierde el 100 % de su actividad a las 10 horas y el derivado inmovilizado mantiene el 57% de su actividad a las 48 horas. Todos estos datos indican que el proceso de inmovilización le confiere a la enzima una gran estabilidad térmica, superior a la estabilidad que le confiere soportes

comerciales (Eupergit C y Eupergit C 250 L), con los que Hernaiz y colaboradores obtuvieron retenciones enzimáticas del 60% a las 24 horas con 30°C y del 65% a las 18 horas con 50°C.<sup>212</sup>



**Figura 119.** Estabilidad térmica de la  $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans* libre e inmovilizada en el polímero poli(AGE-co-DVB)-74 a dos temperaturas: a) 37°C y b) 50°C.

#### 5.4.1.2. Inmovilización-estabilización de $\beta$ -galactosidasa de *Escherichia coli*.

##### 5.4.1.2.1. Caracterización de $\beta$ -galactosidasa de *Escherichia coli*.

Se determinó la cantidad de proteína del preparado enzimático comercial y la actividad enzimática siguiendo la metodología del procedimiento general descrito en el apartado 6.3.1.2.1 de la parte experimental. Las medidas de actividades se realizaron con disoluciones 2 mM de *p*-nitrofenil- $\beta$ -galactopiranosido (PNF- $\beta$ -gal), en tampón tris/HCl 10mM pH 7.3 a 37°C.

La cantidad de enzima observada en el preparado enzimático comercial ( $\beta$ -galactosidasa grado VII de *Escherichia coli*, 3.2.1.23) fue de 34% y la actividad enzimática de 491 U/mg proteína, estos valores son similares a los descritos por otros autores en la bibliografía para el mismo preparado.<sup>209, 534</sup>

##### 5.4.1.2.2. Inmovilización-estabilización de $\beta$ -galactosidasa de *Escherichia coli*.

El proceso de inmovilización se llevó a cabo utilizando el preparado comercial de  $\beta$ -galactosidasa de *Escherichia coli* y todos los polímeros sintetizados en esta memoria de investigación y con un soporte comercial, Eupergit C, para realizar un estudio comparativo.

El proceso de inmovilización se siguió midiendo la cantidad de proteína inmovilizada a las 24 horas, para ello se utilizó la metodología del procedimiento experimental descrito en el apartado 6.3.1.2.2.

Los resultados obtenidos en el proceso de inmovilización de la enzima a los soportes sintetizados, y sobre el Eupergit C, aparecen en la Tabla 96. Como puede observarse en dicha Tabla, todos los polímeros sintetizados en esta memoria originaron unos excelentes porcentajes de inmovilización, superando la mayoría de ellos el porcentaje de inmovilización obtenido con

el polímero comercial Eupergit C (85%) excepto poli(GE-*co*-DVB)-4 (80%) y poli(BGMPME-*co*-DVB)-5 (82%).

Analizando en detalle los datos que aparecen reflejados en la Tabla 96, no se observa ninguna tendencia que relacione la cantidad de enzima inmovilizada con las propiedades texturales de los diversos polímeros empleados en este estudio. Se puede destacar que de los polímeros empleados en este estudio, los polímeros que dan lugar a los resultados más bajos de inmovilización son los más hidrofóbicos (poli(GE-*co*-DVB)-4 (80%) y poli(BGMPME-*co*-DVB)-5 (82%)), dato más que razonable tratándose de la inmovilización de una enzima hidrofílica.

#### **5.4.1.2.3. Caracterización de los derivados inmovilizados de $\beta$ -galactosidasa de *Escherichia coli*.**

Una vez finalizado el proceso de inmovilización se determinó la actividad enzimática de los derivados inmovilizados siguiendo la metodología del procedimiento general descrito en el apartado 6.3.1.2.3 de la parte experimental (Tabla 96). Las medidas de actividades se realizaron con disoluciones 2 mM de *p*-nitrofenil- $\beta$ -galactopiranosido (PNF- $\beta$ -gal), en tampón tris/HCl 10mM pH 7.3 a 37°C.

Como se puede observar en esta Tabla, el proceso de inmovilización llevado a cabo con todos los polímeros origina la pérdida total de actividad de la enzima. Esta enzima está formada por cuatro monómeros (enzima tetramera), cada uno de los cuales posee un centro activo, en el que están presentes dos histidinas,<sup>535</sup> y 19 cisteínas. Los grupos funcionales SH de las cisteínas son muy importantes para mantener la estructura terciaria de esta enzima.<sup>536</sup> La pérdida de actividad de esta enzima originada por el proceso de inmovilización puede ser debida a la deformación de la estructura terciaria activa originada por la inmovilización multipuntual de la enzima por diversos residuos cisteína, por la inmovilización de la enzima por un aminoácido del centro activo (histidina) o próximo a él (cisteínas), ó por una combinación de ambos fenómenos.

Evaluando los resultados obtenidos en este proceso de inmovilización-estabilización de  $\beta$ -galactosidasa de *Escherichia coli* sobre los polímeros sintetizados y sobre el Eupergit C, se decidió no llevar a cabo la caracterización de estos derivados y su aplicación de los derivados inmovilizados obtenidos en la síntesis enzimática de oligosacáridos, debido a que no se lograron obtener derivados inmovilizados activos.

Se puede concluir que, la enzima  $\beta$ -galactosidasa de *Escherichia coli* puede ser una enzima que debe ser inmovilizada por un método diferente al empleado, es decir, un método que no sea a través de la formación de un enlace covalente entre los residuos de la enzima y los grupos epóxido de los soportes.

**Tabla 96.** Resultados obtenidos en la inmovilización de la  $\beta$ -galactosidasa de *Escherichia coli* sobre los polímeros sintetizados y sobre el Eupergit C.

Soporte	Volumen de poro (mL)	Tamaño de poro (nm)	Superficie específica BET (m <sup>2</sup> /g)	Grado de epoxidación (mmol/g)	Enzima inmovilizada (%)	Carga enzimática (mg enzima/g soporte)	Actividad enzimática U/mg <sup>a</sup>	(%) <sup>b</sup>
Enzima libre	-	-	-	-	-	-	491	100
Poli(AGE-co-DVB)-74	0,55	25	97	2.0	100	10	0	0
Poli(ADGGE-co-DVB)-50	1,58	26	242	2.2	100	10	0	0
Poli(ATGPE-co-DVB)-13	1,22	24	208	1.2	100	10	0	0
Poli(AGE-co-DAPE-DVB)-4	1,60	20	333	0.9	100	10	0	0
Poli(ADGGE-co-DAPE-DVB)-10	0,86	19	191	0.5	100	10	0	0
Poli(ATGPE-co-DAPE-DVB)-6	1,47	22	280	0.9	100	10	0	0
Poli(GMA-co-EGDMA)-11	0,28	25	45	4.9	100	10	0	0
Poli(GMA-co-HDDMA)-2	0,15	26	27	4.3	100	10	0	0
Poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8	0,33	30	44	4.6	100	10	0	0
Poli(TGPMA-co-EGDMA)-9	0,29	27	44	5.3	100	10	0	0
Poli(GMA-HEMA-co-EGDMA)-9	0,27	27	34	2.9	100	10	0	0
Poli(BGMPMA-HEMA-co-EGDMA)-2	0,13	25	22	1.9	90	9.0	0	0
Poli(TGPMA-HEMA-co-EGDMA)-1	0,20	25	33	1.6	89	8.9	0	0
Poli(GMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1	0,29	31	38	2.4	100	10	0	0
Poli(BGMPMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1	0,09	22	17	1.7	88	8.8	0	0
Poli(TGPMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1	0,09	23	17	2.1	91	9.1	0	0
Poli(GMA-HEMA-DEAEMA-co-EGDMA)-9	0,34	28	51	2.7	100	10	0	0
Poli(TGPMA-HEMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1	0,02	31	2,6	2,0	100	10	0	0
Poli(GE-co-DVB)-4	0,43	24	74	3.2	80	8.0	0	0
Poli(BGMPME-co-DVB)-5	0,33	22	64	2.9	82	8.2	0	0
Poli(TGPME-co-DVB)-3	0,20	23	39	4.0	100	10	0	0
Eupergit C	0,06 <sup>d</sup>	10 <sup>d</sup>	4.5 <sup>d</sup>	0,6 <sup>d</sup>	85	8.5	0	0

<sup>a</sup> Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que hidroliza 1  $\mu$ mol de sustrato en las condiciones citadas en el apartado 6.3.1.2.1 de la parte experimental. La actividad específica está expresada en unidades/mg de enzima (U/mg).

<sup>b</sup> Tasa relativa de hidrólisis de *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido de la enzima inmovilizada respecto a la misma cantidad de enzima nativa. La actividad enzimática de la  $\beta$ -galactosidasa de *Escherichia coli* libre fue 491 U/mg (100%).

<sup>d</sup> De Segura y col.<sup>532</sup>

#### 5.4.1.3. Inmovilización-estabilización de la $\beta$ -galactosidasa recombinante de *Bacillus circulans* $\beta$ -gal-3 ATCC 31382.

Esta enzima recombinante fue producida, aislada y purificada por Carlos Bayón Sánchez, del grupo de Biotransformaciones de la Universidad Complutense de Madrid, a partir de la cepa americana de *Bacillus circulans*. Este estudio de inmovilización-estabilización de  $\beta$ -galactosidasa recombinante de *Bacillus circulans*  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) ATCC 31382 cepa americana fue realizado en colaboración con Carlos Bayón.

#### **5.4.1.3.1. Caracterización de la $\beta$ -galactosidasa recombinante de *Bacillus circulans* $\beta$ -gal-3 ATCC 31382.**

A partir de los extractos obtenidos por Carlos bayón en la purificación de esta enzima, se determinó la cantidad de enzima y su actividad enzimática siguiendo la metodología del procedimiento descrito en el apartado 6.3.1.3.1 de la parte experimental. Las medidas de actividades se realizaron con disoluciones 2 mM de *p*-nitrofenil- $\beta$ -galactopiranosido (PNF- $\beta$ -gal), en tampón fosfato sódico 50 mM pH 6.

La cantidad de enzima observada en el extracto enzimático fue de 3.7 mg/mL y la actividad enzimática de 107 U/mg de enzima.

#### **5.4.1.3.2. Inmovilización-estabilización de la $\beta$ -galactosidasa recombinante de *Bacillus circulans* $\beta$ -gal-3 ATCC 31382.**

El proceso de inmovilización se llevo a cabo empleando el extracto obtenido por Carlos Bayón en la purificación de esta enzima y todos los polímeros sintetizados en esta memoria de investigación y con un soporte comercial (Eupergit C).

El proceso de inmovilización se siguió midiendo la cantidad de proteína inmovilizada a las 24 horas, para ello se utilizó la metodología del procedimiento experimental descrito en el apartado 6.3.1.3.2.

Los resultados obtenidos en el proceso de inmovilización de la enzima a los soportes sintetizados, y sobre el Eupergit C, aparecen en la Tabla 97. Como puede observarse en dicha Tabla, los resultados obtenidos con los distintos polímeros han sido muy diversos, obteniéndose los mejores porcentajes de inmovilización con los polímeros más hidrofílicos (poli(AGE-co-DAPE-DVB)-4 , poli(ADGGE-co-DAPE-DVB)-10 y Poli(ATGPE-co-DAPE-DVB)-6 con el 100% de inmovilización). Por el contrario, los polímeros que dan lugar a los peores porcentajes de inmovilización son los más hidrofóbicos (poli(GE-co-DVB)-4 (28%) y poli(BGMPME-co-DVB)-5 (31%) y poli(TGPME-co-DVB)-3 (32%)), dato más que razonable tratándose de la inmovilización de una enzima hidrófila.

Analizando en detalle los datos que aparecen reflejados en la Tabla 97, no se observa ninguna tendencia que relacione la cantidad de enzima inmovilizada con las propiedades texturales de los diversos polímeros empleados en este estudio.

#### **5.4.1.3.3. Caracterización de los derivados inmovilizados de la $\beta$ -galactosidasa recombinante de *Bacillus circulans* $\beta$ -gal-3 ATCC 31382.**

Una vez finalizado el proceso de inmovilización se determino la actividad enzimática de los derivados inmovilizados siguiendo la metodología del procedimiento general descrito en el apartado 6.3.1.3.3 de la parte experimental. Las medidas de actividades se realizaron con

disoluciones 2 mM de *p*-nitrofenil- $\beta$ -galactopiranosido (PNF- $\beta$ -gal), en tampón fosfato sódico 50 mM pH 6 a 37°C.

Los resultados de la determinación de actividad enzimática observada tras el proceso de inmovilización en los polímeros sintetizados en esta memoria y en el Eupergit C, aparecen reflejados en la Tabla 97.

Como se puede observar en esta Tabla, el proceso de inmovilización llevado a cabo con todos los polímeros origina una drástica pérdida de actividad enzimática. Este fenómeno, originado por el proceso de inmovilización, puede ser debido a la modificación de la estructura terciaria activa de la enzima originada por la inmovilización de la enzima por diversos residuos (lisina, cisteína ó histidina) del centro activo de la enzima ó próximo a él.

**Tabla 97.** Resultados obtenidos en la inmovilización de la  $\beta$ -galactosidasa recombinante de *Bacillus circulans*  $\beta$ -gal-3 ATCC 31382 sobre los polímeros sintetizados y sobre el Eupergit C.

Soporte	Volumen de poro (mL)	Tamaño de poro (nm)	Superficie específica BET (m <sup>2</sup> /g)	Grado de epoxidación (mmol/g)	Enzima inmovilizada (%)	Carga enzimática (mg enzima/g soporte)	Actividad enzimática U/mg <sup>a</sup>	(%) <sup>b</sup>
Enzima libre	-	-	-	-	-	-	107	100
Poli(AGE-co-DVB)-74	0,55	25	97	2.0	85	8.5	3.6	3.4
Poli(ADGGE-co-DVB)-50	1,58	26	242	2.2	78	7.8	1.1	1.0
Poli(ATGPE-co-DVB)-13	1,22	24	208	1.2	73	7.3	1.3	1.2
Poli(AGE-co-DAPE-DVB)-4	1,60	20	333	0.9	100	10	0.9	0.8
Poli(ADGGE-co-DAPE-DVB)-10	0,86	19	191	0.5	100	10	1.2	1.1
Poli(ATGPE-co-DAPE-DVB)-6	1,47	22	280	0.9	100	10	0.3	0.3
Poli(GMA-co-EGDMA)-11	0,28	25	45	4.9	41	4.1	0.4	0.4
Poli(GMA-co-HDDMA)-2	0,15	26	27	4.3	34	3.4	0.1	0.1
Poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8	0,33	30	44	4.6	43	4.3	0.6	0.6
Poli(TGPMA-co-EGDMA)-9	0,29	27	44	5.3	38	3.8	0.3	0.3
Poli(GMA-HEMA-co-EGDMA)-9	0,27	27	34	2.9	71	7.1	2.5	2.3
Poli(BGMPMA-HEMA-co-EGDMA)-2	0,13	25	22	1.9	60	6.0	1.1	1.0
Poli(TGPMA-HEMA-co-EGDMA)-1	0,20	25	33	1.6	46	4.6	1.9	1.8
Poli(GMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1	0,29	31	38	2.4	48	4.8	0.3	0.3
Poli(BGMPMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1	0,09	22	17	1.7	35	3.5	0.1	0.1
Poli(TGPMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1	0,09	23	17	2.1	34	3.4	0.1	0.1
Poli(GMA-HEMA-DEAEMA-co-EGDMA)-9	0,34	28	51	2.7	65	6.5	0.4	0.4
Poli(TGPMA-HEMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1	0,02	31	2,6	2,0	57	5,7	0,5	0,5
Poli(GE-co-DVB)-4	0,43	24	74	3,2	28	2,8	0,1	0,1
Poli(BGMPME-co-DVB)-5	0,33	22	64	2,9	31	3,1	0	0
Poli(TGPME-co-DVB)-3	0,20	23	39	4,0	32	3,2	0,2	0,2
Eupergit C	0,06 <sup>d</sup>	10 <sup>d</sup>	4,5 <sup>d</sup>	0,6 <sup>d</sup>	45	4,5	1,5	1,4

<sup>a</sup> Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que hidroliza 1  $\mu$ mol de sustrato en las condiciones citadas en el apartado 6.3.1.3.1 de la parte experimental. La actividad específica está expresada en unidades/mg de enzima (U/mg).

<sup>b</sup> Tasa relativa de hidrólisis de *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido de la enzima inmovilizada respecto a la misma cantidad de enzima nativa. La actividad enzimática de la  $\beta$ -galactosidasa recombinante de *B. circulans*  $\beta$ -gal-3 ATCC 31382 libre fue 107 U/mg (100%).

<sup>d</sup> De Segura y col.<sup>532</sup>

Evaluando los resultados obtenidos en este proceso de inmovilización-estabilización de  $\beta$ -galactosidasa recombinante de *B. circulans*  $\beta$ -gal-3 ATCC 31382 sobre los polímeros sintetizados y sobre el Eupergit C, se decidió no llevar a cabo la caracterización de los derivados inmovilizados obtenidos y su aplicación en la síntesis enzimática de oligosacáridos. A su vez, se decidió intentar inmovilizar-estabilizar esta enzima empleando otras técnicas, como son la inmovilización por adsorción sobre diferentes sustratos y la formación de CLEAs (entrecruzamiento con glutaraldehído). Estos nuevos estudios de inmovilización-estabilización están siendo realizados por Carlos Bayón y serán objeto de su Tesis Doctoral.

Se puede concluir que, la enzima  $\beta$ -galactosidasa de *Escherichia coli* puede ser una enzima que debe ser inmovilizada por un método diferente al empleado, es decir, un método que no sea a través de la formación de un enlace covalente entre los residuos de la enzima y los grupos epóxido de los soportes.

#### **5.4.1.4. Inmovilización-estabilización de la $\beta$ -galactosidasa de *Thermus thermophilus* TTP0042.**

Esta enzima fue proporcionada por el Prof. Dr. José Berenguer Carlos del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa de Madrid. Este estudio de inmovilización-estabilización de  $\beta$ -galactosidasa de *Thermus thermophilus* TTP0042 fue realizado en colaboración con Manuel Sandoval Barrantes, del grupo de Biotransformaciones de la Universidad Complutense de Madrid.

##### **5.4.1.4.1. Caracterización de la $\beta$ -galactosidasa de *Thermus thermophilus* TTP0042.**

A partir de los extractos proporcionados por el Prof. Dr. José Berenguer Carlos del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa de Madrid, se determinó la cantidad de enzima y su actividad enzimática siguiendo la metodología del procedimiento descrito en el apartado 6.3.1.4.1 de la parte experimental. Las medidas de actividades se realizaron con disoluciones 2 mM de *p*-nitrofenil- $\beta$ -galactopiranosido (PNF- $\beta$ -gal), en tampón fosfato sódico 50 mM pH 7 a 80°C.

La cantidad de enzima observada en el extracto enzimático fue de 2.5 mg/mL y la actividad enzimática de 326 U/mg de enzima.

##### **5.4.1.4.2. Inmovilización-estabilización de la $\beta$ -galactosidasa de *Thermus thermophilus* TTP0042.**

El proceso de inmovilización se llevo a cabo empleando el extracto proporcionado por el Prof. Dr. José Berenguer Carlos del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa de Madrid y



todos los polímeros sintetizados en esta memoria de investigación y un soporte comercial (Eupergit C).

El proceso de inmovilización se siguió midiendo la cantidad de proteína inmovilizada a las 24 horas, para ello se utilizó la metodología del procedimiento experimental descrito en el apartado 6.3.1.4.2.

Los resultados obtenidos en el proceso de inmovilización de la enzima a los soportes sintetizados, y sobre el Eupergit C, aparecen en la Tabla 98. Como puede observarse en dicha Tabla, los resultados obtenidos con los todos polímeros han sido excelentes (superior al 90% de inmovilización), excepto con el polímero poli(BGMPME-*co*-DVB)-5 (54%).

#### **5.4.1.4.3. Caracterización de los derivados inmovilizados de $\beta$ -galactosidasa de *Thermus thermophilus* TTP0042.**

Una vez finalizado el proceso de inmovilización se determinó la actividad enzimática de los derivados inmovilizados siguiendo la metodología del procedimiento general descrito en el apartado 6.3.1.4.3 de la parte experimental. Las medidas de actividades se realizaron con disoluciones 2 mM de *p*-nitrofenil- $\beta$ -galactopiranosido (PNF- $\beta$ -gal), en tampón fosfato sódico 50 mM pH 7 a 80°C.

Los resultados de la determinación de actividad enzimática observada tras el proceso de inmovilización, sobre los polímeros sintetizados en esta memoria y en el Eupergit C, aparecen reflejados en la Tabla 98.

Como se puede observar en esta Tabla, el proceso de inmovilización llevado a cabo con todos los polímeros origina una drástica pérdida de actividad enzimática. Este fenómeno, originado por el proceso de inmovilización, puede ser debido a la modificación de la estructura terciaria activa de la enzima originada por la inmovilización de la enzima por diversos residuos (lisina, cisteína ó histidina) del centro activo de la enzima ó próximo a él. En concreto esta enzima posee 5 lisinas, alejadas del centro activo, y dos cisteínas, una de ellas (Cys-167) se encuentra muy cerca del centro activo, susceptibles de reaccionar con los grupos epóxido de los polímeros. Gracias al diseño y producción de mutantes realizado por el doctorando Carlos Bayón (grupo de Biotransformaciones de la Universidad Complutense de Madrid) en el laboratorio del Prof. Dr. Berenguer y con la colaboración del Dr. Aurelio Hidalgo (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa de Madrid), se pudo demostrar que el papel que desempeña la cisteína de la posición 167 en la enzima original es crucial en la actividad enzimática de dicha enzima. Por ello, podemos asumir que la pérdida de actividad de la enzima, originada por el proceso de inmovilización, se debe a que las cisteínas de las posiciones 167 de las enzimas reaccionan con los grupos epóxidos de los soportes.

**Tabla 98.** Resultados obtenidos en la inmovilización de la  $\beta$ -galactosidasa de *Thermus thermophilus* TTP0042 sobre los polímeros sintetizados y sobre el Eupergit C.

Soporte	Volumen de poro (mL)	Tamaño de poro (nm)	Superficie específica BET (m <sup>2</sup> /g)	Grado de epoxidación (mmol/g)	Enzima inmovilizada (%)	Carga enzimática (mg enzima/g soporte)	Actividad enzimática U/mg <sup>a</sup>	(%) <sup>b</sup>
Enzima libre	-	-	-	-	-	-	326	100
Poli(AGE-co-DVB)-74	0,55	25	97	2.0	100	10	1.5	0.46
Poli(ADGGE-co-DVB)-50	1,58	26	242	2.2	100	10	1.2	0.36
Poli(ATGPE-co-DVB)-13	1,22	24	208	1.2	100	10	0.5	0.16
Poli(AGE-co-DAPE-DVB)-4	1,60	20	333	0.9	97	9.7	0.7	0.20
Poli(ADGGE-co-DAPE-DVB)-10	0,86	19	191	0.5	97	9.7	0.5	0.14
Poli(ATGPE-co-DAPE-DVB)-6	1,47	22	280	0.9	100	10	0.8	0.24
Poli(GMA-co-EGDMA)-11	0,28	25	45	4.9	100	10	16.3	4.99
Poli(GMA-co-HDDMA)-2	0,15	26	27	4.3	90	9.0	3.0	0.92
Poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8	0,33	30	44	4.6	93	9.3	10.6	3.25
Poli(TGPMA-co-EGDMA)-9	0,29	27	44	5.3	94	9.4	9.6	2.96
Poli(GMA-HEMA-co-EGDMA)-9	0,27	27	34	2.9	100	10	14.9	4.56
Poli(BGMPMA-HEMA-co-EGDMA)-2	0,13	25	22	1.9	98	9.8	12.8	3.92
Poli(TGPMA-HEMA-co-EGDMA)-1	0,20	25	33	1.6	96	9.6	9.2	2.81
Poli(GMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1	0,29	31	38	2.4	100	10	1.6	0.67
Poli(BGMPMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1	0,09	22	17	1.7	100	10	1.3	0.40
Poli(TGPMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1	0,09	23	17	2.1	100	10	1.8	0.56
Poli(GMA-HEMA-DEAEMA-co-EGDMA)-9	0,34	28	51	2.7	100	10	7.4	2.28
Poli(TGPMA-HEMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1	0,02	31	2,6	2,0	100	100	6.1	1.87
Poli(GE-co-DVB)-4	0,43	24	74	3.2	100	10	1.0	0.31
Poli(BGMPME-co-DVB)-5	0,33	22	64	2.9	53	5.3	1.0	0.31
Poli(TGPME-co-DVB)-3	0,20	23	39	4.0	100	10	1.8	0.56
Eupergit C	0,06 <sup>d</sup>	10 <sup>d</sup>	4.5 <sup>d</sup>	0,6 <sup>d</sup>	90	9.0	1.1	0.33

<sup>a</sup> Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que hidroliza 1  $\mu$ mol de sustrato en las condiciones citadas en el apartado 6.3.1.4.1 de la parte experimental. La actividad específica está expresada en unidades/mg de enzima (U/mg).

<sup>b</sup> Tasa relativa de hidrólisis de *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido de la enzima inmovilizada respecto a la misma cantidad de enzima nativa. La actividad enzimática de la  $\beta$ -galactosidasa de *Thermus thermophilus* TTP0042 fue 326 U/mg (100%).

<sup>d</sup> De Segura y col.<sup>532</sup>

Evaluando los resultados obtenidos en este proceso de inmovilización-estabilización de  $\beta$ -galactosidasa de *Thermus thermophilus* TTP0042 sobre los polímeros sintetizados y sobre el Eupergit C, se decidió no llevar a cabo la caracterización de los derivados inmovilizados obtenidos y su aplicación en la síntesis enzimática de oligosacáridos y se decidió intentar inmovilizar-estabilizar esta enzima empleando otras técnicas, como son la inmovilización por adsorción sobre diferentes sustratos y la formación de CLEAs. Estos nuevos estudios de inmovilización-estabilización están siendo realizados por D. Manuel Sandoval y serán objeto de su Tesis Doctoral.

Se puede concluir que, la enzima  $\beta$ -galactosidasa de *Escherichia coli* puede ser una enzima que debe ser inmovilizada por un método diferente al empleado, es decir, un método que no sea a través de la formación de un enlace covalente entre los residuos de la enzima y los grupos epóxido de los soportes.

## 5.4.2. Inmovilización-estabilización de lipasas.

### 5.4.2.1. Inmovilización-estabilización de lipasa de *Pseudomonas fluorescens*.

#### 5.4.2.1.1. Caracterización de la enzima comercial.

Se determinó la cantidad de proteína del preparado enzimático comercial y la actividad enzimática siguiendo la metodología del procedimiento general descrito en el apartado 6.3.2.1.1 de la parte experimental. Las medidas de actividades se realizaron con disoluciones 1 mM de *p*-nitrofenil-palmitato, en tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7.0, 10% en 2-propanol, a una temperatura de 25°C.

La cantidad de enzima observada en el preparado enzimático comercial (Amano lipasa AK de *Pseudomonas fluorescens*) fue de 1.2 % y la actividad enzimática de 611 U mg<sup>-1</sup> proteína.

#### 5.4.2.1.2. Inmovilización de lipasa de *Pseudomonas fluorescens*.

El proceso de inmovilización se llevó a cabo utilizando el preparado comercial de lipasa de *Pseudomonas fluorescens* y todos los polímeros sintetizados en esta memoria de investigación y con un soporte comercial, Eupergit C, para realizar un estudio comparativo.

El proceso de inmovilización se siguió midiendo la cantidad de proteína inmovilizada a las 24 horas, para ello se utilizó la metodología descrita en el apartado 6.3.2.1.2 de la parte experimental.

Los resultados obtenidos en el proceso de inmovilización de la enzima a los soportes sintetizados, y sobre el Eupergit C, aparecen en la Tabla 99. Como puede observarse en dicha Tabla, todos los polímeros sintetizados originaron unos buenos porcentajes de inmovilización a excepción de poli(ATGPE-co-DVB)-13 (32%), poli(AGE-co-DAPE-DVB)-4 (26%), poli(ADGGE-co-DAPE-DVB)-10 (28%) y poli(GE-co-DVB)-4 (30%), que dieron lugar a bajos porcentajes de inmovilización, muy cercanos al obtenido con el polímero comercial Eupergit C (22%).

Analizando en detalle los resultados obtenidos (Tabla 99), no se observa ninguna tendencia que relacione la cantidad de enzima inmovilizada con las propiedades texturales de los diversos polímeros empleados en este estudio.

#### 5.4.2.1.3. Caracterización de los derivados inmovilizados de la lipasa de *Pseudomonas fluorescens*.

Una vez finalizado el proceso de inmovilización se determinó la actividad enzimática de los derivados inmovilizados siguiendo la metodología del procedimiento general descrito en el apartado 6.3.2.1.3 de la parte experimental. Las medidas de actividades se realizaron con disoluciones 1 mM de *p*-nitrofenil-palmitato, en tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7.0, 10% en

2-propanol, a una temperatura de 25°C. Los resultados de la determinación de actividad enzimática observada tras el proceso de inmovilización en los polímeros sintetizados en esta memoria y en el Eupergit C, aparecen reflejados en la Tabla 99.

**Tabla 99.** Resultados obtenidos en la inmovilización de la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* sobre los polímeros sintetizados y sobre el Eupergit C.

Soporte	Volumen de poro (mL)	Tamaño de poro (nm)	Superficie específica BET (m <sup>2</sup> /g)	Grado de epoxidación (mmol/g)	Enzima inmovilizada (%)	Carga enzimática (mg enzima/g soporte)	Actividad enzimática U/mg <sup>a</sup>	(%) <sup>b</sup>
Enzima libre	-	-	-	-	-	-	611	100
Poli(AGE-co-DVB)-74	0,55	25	97	2.0	100	10	147	24
Poli(ADGGE-co-DVB)-50	1,58	26	242	2.2	53	5,3	244	40
Poli(ATGPE-co-DVB)-13	1,22	24	208	1.2	32	3,2	171	28
Poli(AGE-co-DAPE-DVB)-4	1,60	20	333	0.9	26	2,6	134	22
Poli(ADGGE-co-DAPE-DVB)-10	0,86	19	191	0.5	28	2,8	183	30
Poli(ATGPE-co-DAPE-DVB)-6	1,47	22	280	0.9	100	10	177	29
Poli(GMA-co-EGDMA)-11	0,28	25	45	4.9	100	10	318	52
Poli(GMA-co-HDDMA)-2	0,15	26	27	4.3	100	10	489	80
Poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8	0,33	30	44	4.6	94	9,4	391	64
Poli(TGPMA-co-EGDMA)-9	0,29	27	44	5.3	100	10	171	28
Poli(GMA-HEMA-co-EGDMA)-9	0,27	27	34	2.9	100	10	73	12
Poli(BGMPMA-HEMA-co-EGDMA)-2	0,13	25	22	1.9	83	8,3	379	62
Poli(TGPMA-HEMA-co-EGDMA)-1	0,20	25	33	1.6	100	10	428	70
Poli(GMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1	0,29	31	38	2.4	100	10	330	54
Poli(BGMPMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1	0,09	22	17	1.7	80	8	367	60
Poli(TGPMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1	0,09	23	17	2.1	72	7,2	446	73
Poli(GMA-HEMA-DEAEMA-co-EGDMA)-9	0,34	28	51	2.7	100	10	306	50
Poli(TGPMA-HEMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1	0,02	31	2,6	2,0	93	9,3	477	78
Poli(GE-co-DVB)-4	0,43	24	74	3.2	30	3	153	25
Poli(BGMPME-co-DVB)-5	0,33	22	64	2.9	100	10	244	40
Poli(TGPME-co-DVB)-3	0,20	23	39	4.0	100	10	92	15
Eupergit C	0,06 <sup>c</sup>	10 <sup>c</sup>	4.5 <sup>c</sup>	0,6 <sup>c</sup>	22	0,22	385	63

<sup>a</sup> Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que hidroliza 1 μmol de sustrato en las condiciones citadas en el apartado 6.3.2.1.3 de la parte experimental. La actividad específica está expresada en unidades/mg de enzima (U/mg).

<sup>b</sup> Tasa relativa de hidrólisis de p-nitrofenil-palmitato de la enzima inmovilizada respecto a la misma cantidad de enzima nativa. La actividad enzimática de la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* libre fue 611 U/mg (100%).

<sup>c</sup> De Segura y col.<sup>532</sup>

En la Tabla 99, se han resaltado en azul los resultados positivos, en rojo el mejor resultado y en amarillo el resultado con el soporte comercial. Como se puede observar en esta Tabla, sólo 5 de los polímeros sintetizados mejoran la retención de actividad catalítica retenida obtenida por el soporte comercial (Eupergit C).

Analizando en detalle los datos que aparecen reflejados en la Tabla 99, no se observa ninguna tendencia que relacione la actividad catalítica retenida por los derivados inmovilizados con las propiedades texturales de los diversos polímeros empleados en este estudio. A su vez puede observarse que los mejores porcentajes de retención de actividad catalítica se han

obtenido con los polímeros metacrílicos, por lo que puede asumirse que esta enzima se estabiliza mejor en soportes de hidrofobicidad intermedia y que la magnitud de la estabilidad depende de la estructura tridimensional del soporte polimérico.

- **Optimización de la carga enzimática en poli(GMA-co-HDDMA)-2.**

De los mejores resultados, se seleccionó el polímero que presentó una mayor actividad en la hidrólisis del PNF-palmitato, que fue el poli(GMA-co-HDDMA)-2, y se llevó a cabo un estudio de optimización de la carga enzimática siguiendo la metodología descrita en el apartado 6.3.2.1.2. En la Tabla 100 se presentan los resultados obtenidos en este proceso de optimización, y como se puede observar, se ha conseguido mejorar el porcentaje de actividad del derivado inmovilizado al aumentar la carga enzimática. En esta Tabla también se puede observar un estudio comparativo con los resultados obtenidos por otros grupos de investigación. Algunos de estos trabajos publicados no aportan datos de carga enzimática ó retención de actividad catalítica.

**Tabla 100.** Estudio comparativo de los resultados obtenidos en el proceso de optimización de la carga enzimática en el soporte poli(GMA-co-HDDMA)-2 con los resultados obtenidos por otros grupos de investigación.

Soporte	Carga enzimática en disolución (mg enzima/g soporte)	Carga enzimática inmovilizada (mg enzima/g soporte)	Enzima inmovilizada (%)	Actividad enzimática		
				U/mg <sup>a</sup>	(%) <sup>b</sup>	
Enzima libre	-	-	-	611	100	
poli(GMA-co-HDDMA)-2	10	10	100	489	80	
	20	12	60	519	85	
	30	12,9	43	415	68	
Toyonite 200-M <sup>429</sup>	2,4	2,4	100	-	-	
Membrana PES 300 <sup>430</sup>	-	2.0-3.2 g enzima/m <sup>2</sup>	-	-	-	
Sílica modificada 1 <sup>431</sup>	50	49	98	-	71	
Sílica modificada 2 <sup>431</sup>	50	37	74	-	14	
Polisiloxano-PVA1 <sup>432</sup>	200	32	16	-	4	
Polisiloxano-PVA2 <sup>432</sup>		64	32	-	12	
SBA-15 <sup>433</sup>	400	3,2	0,8	-	-	
MSE <sup>433</sup>			4,7	1,2	-	-
Sepabeads EC-EP <sup>433</sup>			6,1	1,5	-	-
Accurel <sup>433</sup>			6,3	1,5	-	-
SBA-15-R-CHO <sup>433</sup>			6,5	1,6	-	-
SiO <sub>2</sub> -PVA+PEG 1500 <sup>434</sup>			5	5	100	-
Xerogeles-siloxanos-LI <sup>435</sup>	200	200	100	-	20-34	
Celite 545-silanos <sup>436</sup>	100	100	100	-	18	

<sup>a</sup> Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que hidroliza 1  $\mu$ mol de sustrato en las condiciones citadas en el apartado 6.3.2.1.3 de la parte experimental. La actividad específica está expresada en unidades/mg de enzima (U/mg).

<sup>b</sup> Porcentaje de retención de la actividad catalítica de la enzima inmovilizada. Con los soportes sintetizados en esta memoria se refiere a la tasa relativa de hidrólisis de *p*-nitrofenil-palmitato de la enzima inmovilizada respecto a la misma cantidad de enzima nativa. La actividad enzimática de la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* libre fue 611 U/mg (100%).

<sup>429</sup> No proporcionan datos de actividad enzimática de hidrólisis, hacen una comparativa entre la enzima libre e inmovilizada de las conversiones obtenidas en la transesterificación del oleato con propionato y butirato de vinilo.

<sup>430</sup> No proporcionan muchos datos: carga enzimática cruda (2.0-3.2 g enzima/m<sup>2</sup> de membrana), comparativa de conversión en la reacción de hidrólisis de trioleína.

<sup>431</sup> Tasa relativa de hidrólisis de triacetina (2%) en disolución 0.05M NaCl, 0.05M CaCl<sub>2</sub>, pH: 7.0, 20°C: enzima libre (52 mmol/mg enzima h), sílica modificada 1(37 mmol/mg enzima h), sílica modificada 2 (0.7300 mmol/mg enzima h).

<sup>432</sup> Tasa relativa de hidrólisis de aceite de oliva en una emulsión con agua (1:1), pH 6.1, 53°C: enzima libre (9282U/mg), Polixilisano-PVA1 (404 U/mg) y Polixilisano-PVA (1109 U/mg).

<sup>433</sup> No proporciona datos de actividad enzimática de la enzima libre. Presenta un estudio comparativo de la enzima inmovilizada sobre diferentes soportes en síntesis de biodiesel.

<sup>434</sup> Presenta un estudio comparativo, de varias enzimas inmovilizadas sobre SiO<sub>2</sub>-PVA+PEG 1500, en la reacción de esterificación de xilitol con ácido oleico.

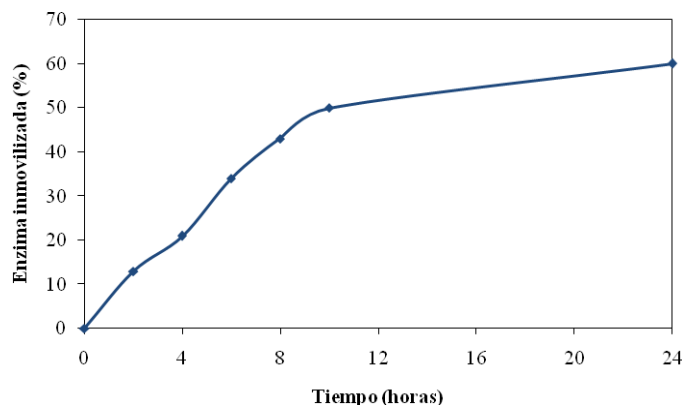
<sup>435</sup> Estudio comparativo de la eficiencia catalítica, en la reacción de transesterificación de 2-heptanol con acetato de vinilo en *n*-hexano, de derivados inmovilizados obtenidos por adsorción de la enzima en xerogeles empleando diferentes silanos y líquidos iónicos respecto a la enzima libre.

<sup>436</sup> Condiciones de reacción: 1 mL hexano:THF (2:1), 0.4 mmol de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol y 0.8 mmol de butirato de vinilo. T<sup>a</sup>: 30°C, 1000 r.p.m.

Como se puede observar en la Tabla 100, el mejor porcentaje de actividad catalítica retenida se ha obtenido empleando una relación enzima/polímero de 20mg de enzima/g de soporte (85%). Este dato mejora los resultados de retención de actividad enzimática obtenidos por otros grupos de investigación (4-71%).<sup>431, 432, 435, 436</sup>

Una vez seleccionada la carga enzimática que proporciona al derivado inmovilizado la mejor actividad enzimática, se lleva a cabo la inmovilización de la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* siguiendo el protocolo descrito en el apartado 6.3.2.1.2, con el objetivo de obtener suficiente cantidad de derivado inmovilizado para llevar a cabo las aplicaciones sintéticas.

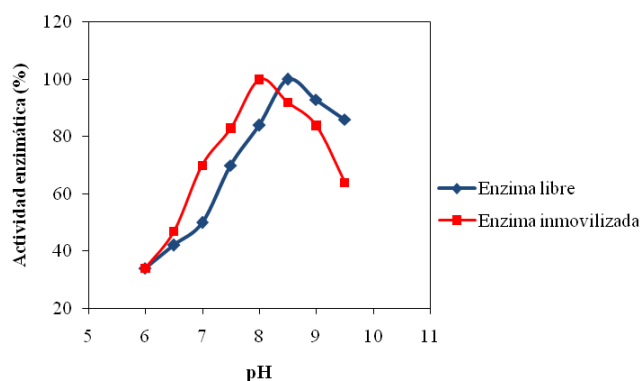
Los resultados obtenidos en cuanto a la evolución del proceso de anclaje de la enzima al soporte seleccionado a lo largo del tiempo aparecen representados en la Figura 120.



**Figura 120.** Evolución del anclaje enzimático durante el proceso de inmovilización de la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* sobre poli(GMA-co-HDDMA)-2.

- **Efecto del pH en la actividad catalítica de la enzima libre y el derivado poli(GMA-co-HDDMA)-2.**

Se realizó un estudio de la influencia que tiene el pH en la actividad enzimática de la lipasa de *Pseudomonas fluorescens*, tanto libre como inmovilizada en el polímero poli (GMA-co-HDDMA)-2, siguiendo la metodología descrita en el apartado 6.3.2.1.3. En la Figura 121 se pueden observar los resultados obtenidos en este estudio. Como se puede ver, el pH óptimo para la enzima inmovilizada (pH 8.0) es un poco inferior al de la enzima libre (pH 8.5). Este fenómeno debe presumiblemente a cambios en el  $pK_a$  de residuos funcionales de la enzima.



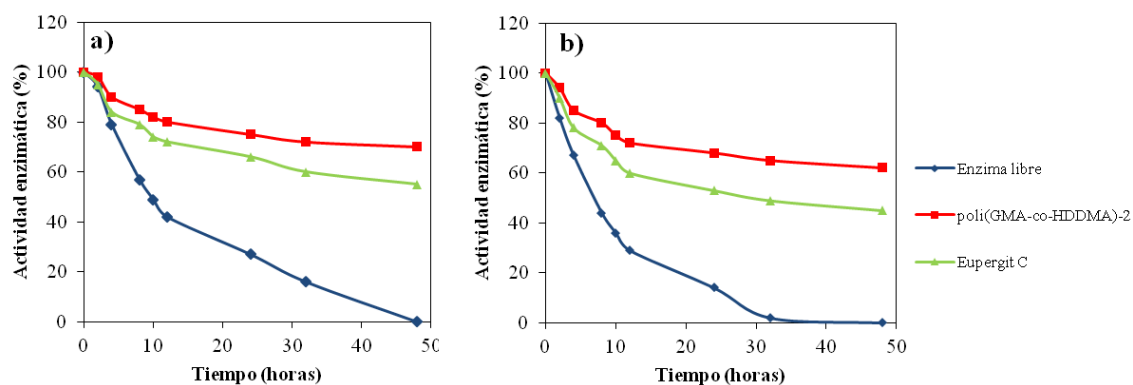
**Figura 121.** Influencia del pH en la actividad enzimática de la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* libre e inmovilizada sobre el polímero poli(GMA-co-HDDMA)-2.

- **Estabilidad térmica de la enzima libre y del derivado poli(GMA-co-HDDMA)-2.**

Con el objetivo de verificar la estabilidad que proporciona el proceso de inmovilización a la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* en el polímero poli(GMA-co-HDDMA)-2, se llevó a cabo un estudio de termo estabilidad de la enzima libre e inmovilizada a dos temperaturas, 37 °C (Figura 122-a) y 50 °C (Figura 122-b), siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.3.2.1.3. En la Figura 116 se presentan los resultados obtenidos en este estudio, incluyéndose la comparativa con un soporte comercial, el Eupergit C. Como se puede observar en la Figura 122-a, el enzima libre pierde el 50 % de su actividad a las 10 horas y el 100 % a las 48 horas. Por el contrario, los derivados con poli(GMA-co-HDDMA)-2 y Eupergit C mantienen respectivamente el 70 % y el 55 % de su actividad a las 48 horas. A 50 °C (Figura 122, b) el comportamiento es similar, en este caso el enzima libre pierde el 100 % de su actividad a las 35 horas y los derivados con poli(GMA-co-HDDMA)-2 y Eupergit mantienen respectivamente el 65% y 50% de su actividad a las 35 horas. Todos estos datos indican que el proceso de inmovilización en el polímero poli(GMA-co-HDDMA)-2 le confiere a la enzima una gran estabilidad, superior a la que le confiere el soporte comercial (Eupergit C).

Pocos son los artículos publicados sobre la inmovilización de enzimas que hacen referencia a la estabilidad térmica de los derivados inmovilizados. De todos los trabajos

referenciados en el apartado de antecedentes, sobre la inmovilización de la lipasa de *Ps. fluorescens*, solo uno de ellos <sup>429</sup> proporciona datos de estabilidad térmica. En dicho estudio el derivado inmovilizado retiene el 63% de su actividad catalítica inicial tras 10 horas a 50°C. Estos resultados son muy parecidos a los obtenidos en esta memoria con el soporte comercial Eupergit C (64% retención de actividad catalítica), pero inferiores a los obtenidos con el polímero poli(GMA-co-HDDMA)-2 (75% retención de actividad catalítica)



**Figura 122.** Estabilidad térmica de la lipasa de *Pseudomonas fluorescens*, libre e inmovilizada sobre poli(GMA-co-HDDMA)-2 y Eupergit C, a dos temperaturas: a) 37°C y b) 50°C.

#### 5.4.2.2. Inmovilización-estabilización de la lipasa de *Pseudomonas cepacia*.

##### 5.4.2.2.1. Caracterización de la enzima comercial.

Se determinó la cantidad de proteína y la actividad enzimática del preparado enzimático comercial siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.3.2.2.1 de la parte experimental. Las medidas de actividades se realizaron con disoluciones 1 mM de *p*-nitrofenil-palmitato, en tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7.0, 10% en 2-propanol, a una temperatura de 25°C.

La cantidad de enzima observada en el preparado enzimático comercial (lipasa PS de *Pseudomonas cepacia*) fue de 1.5 % y la actividad enzimática de 232 U mg<sup>-1</sup> proteína.

##### 5.4.2.2.2. Inmovilización de la lipasa de *Pseudomonas cepacia*.

El proceso de inmovilización se llevó a cabo utilizando el preparado comercial de lipasa de *Pseudomonas cepacia*, todos los polímeros sintetizados en esta memoria de investigación y un soporte comercial, el Eupergit C, para realizar un estudio comparativo.

El proceso de inmovilización se siguió midiendo la cantidad de proteína inmovilizada a las 24 horas, para ello se utilizó la metodología del procedimiento general descrito en el apartado 6.3.2.2.2 de la parte experimental.



Los resultados obtenidos en el proceso de inmovilización de la enzima sobre los soportes sintetizados y sobre el Eupergit C aparecen en la Tabla 101. Como se puede observar en dicha Tabla, todos los polímeros sintetizados originaron buenos porcentajes de inmovilización a excepción de poli(AGE-co-DVB)-74 (10%), Poli(GMA-co-EGDMA)-11 (49%) y poli(GMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1 (48%), que dieron lugar a porcentajes de inmovilización inferiores al 50%. El polímero comercial (Eupergit C) da lugar a un buen porcentaje de inmovilización (86%), sin embargo, 11 de los polímeros sintetizados mejoran este porcentaje de inmovilización, alcanzando 9 de ellos el 100% de inmovilización.

Analizando en detalle los resultados obtenidos (Tabla 101), no se observa ninguna tendencia que relacione la cantidad de enzima inmovilizada con las propiedades texturales de los diversos polímeros empleados en este estudio.

#### **5.4.2.2.3. Caracterización del derivado inmovilizado de la lipasa de *Pseudomonas cepacia*.**

Una vez finalizado el proceso de inmovilización se determinó la actividad enzimática de los derivados inmovilizados siguiendo la metodología del procedimiento general descrito en el apartado 6.3.2.2.3 de la parte experimental. Las medidas de actividades se realizaron con disoluciones 1 mM de *p*-nitrofenil-palmitato, en tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7.0, 10% en 2-propanol, a una temperatura de 25°C.

Los resultados de la determinación de actividad enzimática observada tras el proceso de inmovilización sobre los polímeros sintetizados en esta memoria y sobre el Eupergit C, aparecen reflejados en la Tabla 101. En esta Tabla se han resaltado en azul los resultados positivos, en rojo el mejor resultado y en amarillo el resultado con el soporte comercial. Como se puede observar en esta Tabla, sólo 2 de los polímeros sintetizados, poli(BGMPME-co-DVB)-5 (79%) y poli(TGPMA-co-EGDMA)-9 (72%), mejoran el porcentaje de actividad enzimática retenida por el soporte comercial Eupergit C (70%) y otros dos, poli(GMA-co-HDDMA)-2 y poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8, lo igualan.

Analizando en detalle los resultados obtenidos (Tabla 101), no se observa ninguna tendencia que relacione la actividad catalítica retenida por el derivado inmovilizado con las propiedades texturales de los diversos polímeros empleados en este estudio. A su vez puede observarse que los peores porcentajes de retención de actividad catalítica se han obtenido con los polímeros más hidrofílicos, por lo que puede asumirse que esta enzima se estabiliza mejor en soportes de hidrofobicidad moderada y que la magnitud de la estabilidad depende de la estructura tridimensional del soporte polimérico.

**Tabla 101.** Resultados obtenidos en la inmovilización de la lipasa de *Pseudomonas cepacia* sobre los polímeros sintetizados y sobre el Eupergit C.

Soporte	Volumen de poro (mL)	Tamaño de poro (nm)	Superficie específica BET (m <sup>2</sup> /g)	Grado de epoxidación (mmol/g)	Enzima inmovilizada (%)	Carga enzimática (mg enzima/g soporte)	Actividad enzimática U/mg <sup>a</sup>	(%) <sup>b</sup>
Enzima libre	-	-	-	-	-	-	232	100
Poli(AGE-co-DVB)-74	0,55	25	97	2.0	10	1	53	23
Poli(ADGGE-co-DVB)-50	1,58	26	242	2.2	68	6,8	58	25
Poli(ATGPE-co-DVB)-13	1,22	24	208	1.2	100	10	53	23
Poli(AGE-co-DAPE-DVB)-4	1,60	20	333	0.9	66	6,6	46	20
Poli(ADGGE-co-DAPE-DVB)-10	0,86	19	191	0.5	69	6,9	51	22
Poli(ATGPE-co-DAPE-DVB)-6	1,47	22	280	0.9	62	6,2	128	55
Poli(GMA-co-EGDMA)-11	0,28	25	45	4.9	49	4,9	121	52
Poli(GMA-co-HDDMA)-2	0,15	26	27	4.3	100	10	162	70
Poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8	0,33	30	44	4.6	100	10	162	70
Poli(TGPMA-co-EGDMA)-9	0,29	27	44	5.3	100	10	167	72
Poli(GMA-HEMA-co-EGDMA)-9	0,27	27	34	2.9	53	5,3	111	48
Poli(BGMPMA-HEMA-co-EGDMA)-2	0,13	25	22	1.9	100	10	139	60
Poli(TGPMA-HEMA-co-EGDMA)-1	0,20	25	33	1.6	100	10	153	66
Poli(GMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1	0,29	31	38	2.4	48	4,8	144	62
Poli(BGMPMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1	0,09	22	17	1.7	69	6,9	151	65
Poli(TGPMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1	0,09	23	17	2.1	68	6,8	128	55
Poli(GMA-HEMA-DEAEMA-co-EGDMA)-9	0,34	28	51	2.7	100	10	97	42
Poli(TGPMA-HEMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1	0,02	31	2,6	2,0	100	10	121	52
Poli(GE-co-DVB)-4	0,43	24	74	3.2	89	8,9	116	50
Poli(BGMPME-co-DVB)-5	0,33	22	64	2.9	100	10	183	79
Poli(TGPME-co-DVB)-3	0,20	23	39	4.0	91	9,1	128	55
Eupergit C	0,06 <sup>c</sup>	10 <sup>c</sup>	4.5 <sup>c</sup>	0,6 <sup>c</sup>	86	8,6	162	70

<sup>a</sup> Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que hidroliza 1 μmol de sustrato en las condiciones citadas en el apartado 6.3.2.2.3 de la parte experimental. La actividad específica está expresada en unidades/mg de enzima (U/mg).

<sup>b</sup> Tasa relativa de hidrólisis de p-nitrofenil-palmitato de la enzima inmovilizada respecto a la misma cantidad de enzima nativa. La actividad enzimática de la lipasa de *Pseudomonas cepacia* libre fue 232 U/mg (100%).

<sup>c</sup> De Segura y col.<sup>532</sup>

- **Optimización de la carga enzimática sobre el soporte poli(BGMPME-co-DVB)-5.**

De los mejores resultados se seleccionó polímero que presentó una mayor actividad enzimática en la hidrólisis del PNF-palmitato, el poli(BGMPME-co-DVB)-5, y se llevó a cabo un estudio de optimización de la carga enzimática siguiendo la metodología descrita en el apartado 6.3.2.2.2. En la Tabla 102 se presentan los resultados obtenidos en este proceso de optimización, y como se puede observar, se ha conseguido mejorar el porcentaje de actividad del derivado inmovilizado al aumentar la carga enzimática. En esta Tabla también se puede observar un estudio comparativo con los resultados obtenidos por otros grupos de investigación. Existen otros trabajos publicados sobre la inmovilización de la lipasa de *Pseudomonas cepacia* referenciados anteriormente en el apartado de antecedentes, pero no se han incluido en este

estudio comparativo ya que los resultados publicados en dichos trabajos no son claros ó no aportan datos de retención de actividad catalítica.

Como se puede observar en la Tabla 102, el mejor porcentaje de actividad catalítica retenida se ha obtenido empleando una relación enzima/polímero de 20mg de enzima/g de soporte (86%). Este dato mejora los resultados obtenidos por otros grupos de investigación (14-71%).<sup>465, 466, 468, 471</sup>

**Tabla 102.** Estudio comparativo de los resultados obtenidos en el proceso de optimización de la carga enzimática en el soporte poli(BGMPME-co-DVB)-5 con los resultados obtenidos por otros grupos de investigación.

Soporte	Carga enzimática en disolución (mg enzima/g soporte)	Carga enzimática inmovilizada (mg enzima/g soporte)	Enzima inmovilizada (%)	Actividad enzimática	
				U/mg <sup>a</sup>	(%) <sup>b</sup>
Enzima libre	-	-	-	232	100
poli(BGMPME-co-DVB)-5	10	10	100	183	79
	20	18	90	200	86
	30	21	70	176	76
Fibras de jengibre <sup>438</sup>	60	60	100	-	-
Carbón activo + líquidos iónicos <sup>445</sup>	100	37-67	37-67	-	-
Nano partículas de Zirconio <sup>446</sup>	50	14,5-22,3	29-44	-	-
Nanopartículas magnéticas <sup>447</sup>	28	10,5	38	-	-
Sílica mesoporosa <sup>465</sup>	160	78	49	-	21
Polipropileno microporoso (Acurrel EP-100) <sup>466</sup>	1	0.44	44	-	0.4
Polisiloxano <sup>467</sup>	500	475	95	-	-
Sílicas mesoporosas <sup>468</sup>	MCM-41	0.4	10	-	4
	MCM-48	5.8	0.9	19	11
	SBA-15		4	69	60
Celite <sup>469</sup>	200	200	100	-	-
Celite <sup>470</sup>	500	500	100	-	-
Polipropileno macroporoso <sup>471</sup>	3.3	2.6	79	-	48
Celite <sup>472</sup>	52,5	47	90	-	-
Fibras poliacrilonitrilo <sup>473</sup>	1120	728	65		

<sup>a</sup> Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que hidroliza 1  $\mu$ mol de sustrato en las condiciones citadas en el apartado 6.3.2.2.3 de la parte experimental. La actividad específica está expresada en unidades/mg de enzima (U/mg).

<sup>b</sup> Tasa relativa de hidrólisis de *p*-nitrofenil-palmitato de la enzima inmovilizada respecto a la misma cantidad de enzima nativa. La actividad enzimática de la lipasa de *Pseudomonas cepacia* libre fue 232 U/mg (100%).

<sup>438</sup> No proporcionan datos de actividades enzimáticas hidrolíticas. Realizan un estudio comparativo de la resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol entre la enzima libre y la enzima inmovilizada.

<sup>445</sup> No proporcionan datos de actividades enzimáticas hidrolíticas. Realizan un estudio comparativo de la resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol entre la enzima libre y la enzima inmovilizada.

<sup>446</sup> No proporcionan datos de actividades enzimáticas hidrolíticas. Realizan un estudio comparativo de la resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol entre la enzima libre y la enzima inmovilizada.

<sup>447</sup> No proporcionan datos de actividades enzimáticas hidrolíticas. Realizan un estudio comparativo de la resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol entre la enzima libre y la enzima inmovilizada.

<sup>465</sup> Tasa relativa de hidrólisis *p*-nitrofenil-acetato de la enzima inmovilizada (207 U/mL) respecto a la misma cantidad de enzima nativa (986 U/mL=100%).

<sup>466</sup> Tasa relativa de hidrólisis de *p*-nitrofenil-palmitato de la enzima inmovilizada (10.4 U/mg) respecto a la misma cantidad de enzima nativa. La actividad enzimática de la lipasa de *Pseudomonas cepacia* libre purificada fue 2375 U/mg (100%).

<sup>467</sup> No proporcionan datos de actividades enzimáticas hidrolíticas. Realiza un estudio comparativo de la reacción de transesterificación de aceite de soja con la enzima libre e inmovilizada.

<sup>468</sup> Tasa de hidrólisis del ester metílico de N-(2-etil-6-metilfenil) alanina.

<sup>469</sup> No proporcionan datos de actividades enzimáticas hidrolíticas. Realizan un estudio comparativo de reacción de esterificación de glicerol y análogos de glicerol entre la enzima libre y la enzima inmovilizada.

<sup>470</sup> No proporcionan datos de actividades enzimáticas hidrolíticas. Realizan un estudio comparativo de reacción de síntesis de biodiesel a partir del aceite de la semilla de *Jatropha* entre la enzima libre y la enzima inmovilizada.

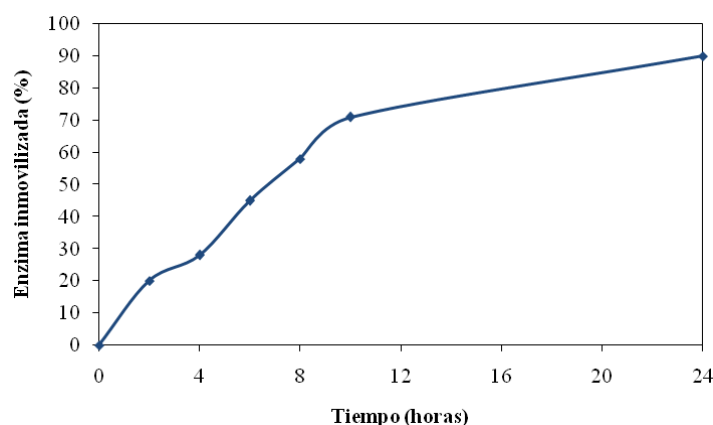
<sup>471</sup> Tasa de hidrólisis de tributirina.

<sup>472</sup> Proporcionan datos de actividades enzimáticas hidrolíticas muy confusos.

<sup>473</sup> No proporcionan datos de actividades enzimáticas hidrolíticas. Realizan un estudio comparativo de reacción de esterificación de (*S*)-glicidol entre la enzima libre y la enzima inmovilizada.

Existen otros trabajos, <sup>448, 463</sup> referenciados en el apartado de antecedentes, en los que los resultados de carga y retención de actividad enzimática son muy confusos, por ello no se han incluido en este estudio comparativo.

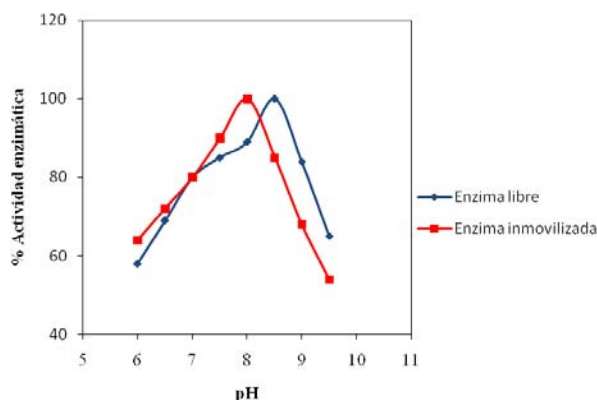
Una vez seleccionada la carga enzimática que proporciona al derivado inmovilizado la mejor actividad enzimática, se lleva a cabo la inmovilización de la lipasa de *Pseudomonas cepacia* siguiendo el protocolo descrito en el apartado 6.3.2.2.2, con el objetivo de obtener suficiente cantidad de derivado inmovilizado para llevar a cabo las aplicaciones sintéticas. Los resultados obtenidos, en cuanto a la evolución del proceso de anclaje de la enzima al soporte seleccionado a lo largo del tiempo, aparecen representada en la Figura 123.



**Figura 123.** Evolución del anclaje enzimático durante el proceso de inmovilización de lipasa de *Pseudomonas cepacia* sobre poli(BGMPME-co-DVB)-5.

- **Efecto del pH en la actividad catalítica en la enzima libre y en el derivado poli(BGMPME-co-DVB)-5.**

Se realizó un estudio de la influencia que tiene el pH en la actividad enzimática de la lipasa PS de *Pseudomonas cepacia*, tanto libre como inmovilizada en el polímero poli(BGMPME-co-DVB)-5, siguiendo la metodología descrita en el apartado 6.3.2.2.3. En la Figura 124 se pueden observar los resultados obtenidos en este estudio. Como se puede ver, el pH óptimo para la enzima inmovilizada (pH 8.0) es un poco inferior al de la enzima libre (pH 8.5). Este fenómeno debe presumiblemente a cambios en el  $pK_a$  de residuos funcionales de la enzima.

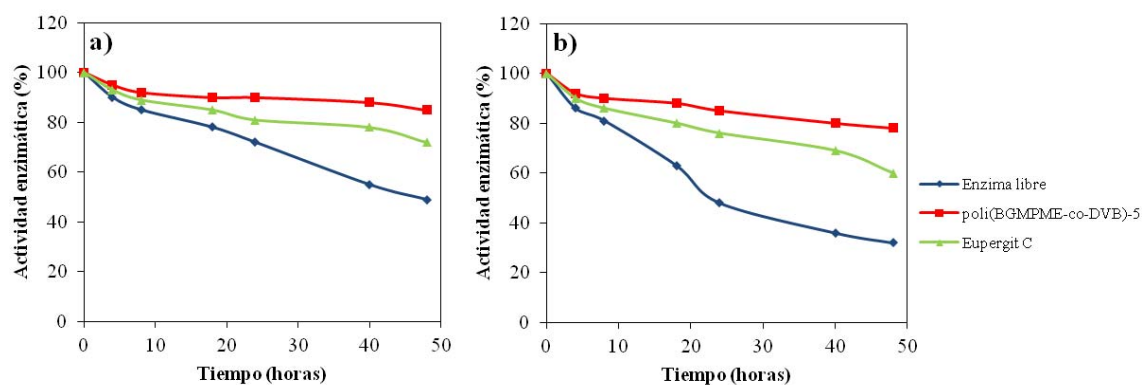


**Figura 124.** Influencia del pH en la actividad enzimática de la lipasa de *Pseudomonas cepacia* libre e inmovilizada sobre poli(BGMPME-co-DVB)-5.

- **Estabilidad térmica de la enzima libre y en el derivado poli(BGMPME-co-DVB)-5.**

Con el objetivo de verificar la estabilidad que proporciona el proceso de inmovilización a la lipasa de *Pseudomonas cepacia* en el polímero poli(BGMPME-co-DVB)-5, se llevó a cabo un estudio de termo estabilidad de la enzima libre e inmovilizada a dos temperaturas, 37°C (Figura 125-a) y 50°C (Figura 125-b), siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.3.2.2.3. En la Figura 119 se presentan los resultados obtenidos en este estudio, incluyéndose la comparativa con un soporte comercial, el Eupergit C. Como se puede observar en la Figura 119-a, el enzima libre pierde el 50 % de su actividad a las 10 horas y el 100 % a las 48 horas. Por el contrario, los derivados con poli(GMA-co-HDDMA)-2 y Eupergit mantienen respectivamente el 70 % y el 55 % de su actividad a las 48 horas. A 50 °C (Figura 125, b) el comportamiento es similar, en este caso el enzima libre pierde el 100 % de su actividad a las 35 horas y los derivados con poli(GMA-co-HDDMA)-2 y Eupergit C mantienen respectivamente el 65% y 50% de su actividad a las 35 horas. Todos estos datos indican que el proceso de inmovilización en el polímero poli(BGMPME-co-DVB)-5 le confiere a la enzima una gran estabilidad, superior a la que le confiere el soporte comercial Eupergit C.

Pocos son los artículos publicados sobre la inmovilización de enzimas que hacen referencia a la estabilidad térmica de los derivados inmovilizados. De todos los trabajos referenciados en el apartado de antecedentes, sobre la inmovilización de la lipasa de *Ps. cepacia*, solo dos de ellos<sup>466, 468</sup> proporciona datos de estabilidad térmica. En dichos estudios el derivado inmovilizado retiene: el 50% y 75% de su actividad catalítica inicial tras 4 y 24 horas a 50°C respectivamente. Estos resultados de estabilidad térmica han sido mejorados en esta memoria empleando el polímero poli(BGMPME-co-DVB)-5 (86% retención de actividad catalítica tras 24 horas a 50°C).



**Figura 125.** Estabilidad térmica de la lipasa de *Pseudomonas cepacia*, libre e inmovilizada en poli(BGMPME-co-DVB)-5 y Eupergit C, a dos temperaturas: a) 37°C y b) 50°C.

#### 5.4.2.3. Inmovilización-estabilización de la lipasa de *Pseudomonas stutzeri*.

##### 5.4.2.3.1. Caracterización de la enzima comercial.

Se determinó la cantidad de proteína y la actividad enzimática del preparado enzimático comercial siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.3.2.3.1 de la parte experimental. Las medidas de actividades se realizaron con disoluciones 1 mM de *p*-nitrofenil-palmitato, en tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7.0, 10% en 2-propanol, a una temperatura de 25°C.

La cantidad de enzima observada en el preparado enzimático comercial (lipasa TL de *Pseudomonas stutzeri*) fue de 16 % y la actividad enzimática de 105 U mg<sup>-1</sup> proteína.

##### 5.4.2.3.2. Inmovilización de la lipasa de *Pseudomonas stutzeri*.

El proceso de inmovilización se llevó a cabo utilizando el preparado comercial de lipasa de *Pseudomonas stutzeri* y todos los polímeros sintetizados en esta memoria de investigación y un soporte comercial, el Eupergit C.

El proceso de inmovilización se siguió midiendo la cantidad de proteína inmovilizada a las 24 horas, para ello se utilizó la metodología del procedimiento general descrito en el apartado 6.3.2.3.2 de la parte experimental.

Los resultados obtenidos en el proceso de inmovilización de la enzima a los soportes sintetizados, y sobre el Eupergit C, aparecen en la Tabla 103. Como puede observarse en dicha Tabla, todos los polímeros sintetizados originaron unos buenos porcentajes de inmovilización (superior al 75% en la mayoría de los casos). El polímero comercial (Eupergit C) también da lugar a un buen porcentaje de inmovilización (72%), sin embargo, todos los polímeros sintetizados en esta memoria mejoran este porcentaje a excepción de Poli(ATGPE-co-DAPE-DVB)-6 (51%) y poli(TGPMA-HEMA-co-EGDMA)-1 (58%).

Analizando en detalle los resultados obtenidos (Tabla 103), no se observa ninguna tendencia que relacione la cantidad de enzima inmovilizada con las propiedades texturales ó con las propiedades hidrofílicas de los diversos polímeros empleados en este estudio.

#### **5.4.2.3.3. Caracterización del derivado inmovilizado de la lipasa de *Pseudomonas stutzeri*.**

Una vez finalizado el proceso de inmovilización se determinó la actividad enzimática de los derivados inmovilizados siguiendo la metodología descrita en el apartado 6.3.2.3.3 de la parte experimental. Las medidas de actividades se realizaron con disoluciones 1 mM de *p*-nitrofenil-palmitato, en tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7.0, 10% en 2-propanol, a una temperatura de 25°C.

Los resultados de la determinación de actividad enzimática observada tras el proceso de inmovilización en los polímeros sintetizados en esta memoria y en el Eupergit C, aparecen reflejados en la Tabla 103.

En la Tabla 103, se han resaltado en azul los resultados positivos, en rojo el mejor resultado y en amarillo el resultado con el soporte comercial (Eupergit C). Como se puede observar, más de la mitad de los polímeros sintetizados mejoran el porcentaje de actividad enzimática retenida por el soporte comercial Eupergit C (45%) en mayor o menor medida.

Analizando en detalle los resultados obtenidos (Tabla 103), no se observa ninguna tendencia que relacione la actividad catalítica retenida por el derivado inmovilizado con las propiedades texturales de los diversos polímeros empleados en este estudio. A su vez puede observarse que los peores porcentajes de retención de actividad catalítica se han obtenido con los polímeros más hidrofílicos y más hidrofóbicos, por lo que puede asumirse que esta enzima se estabiliza mejor en soportes de hidrofobicidad media y que la magnitud de la estabilidad depende de la estructura tridimensional del soporte polimérico.

**Tabla 103.** Resultados obtenidos en la inmovilización de la lipasa de *Pseudomonas stutzeri* sobre los polímeros sintetizados y sobre el Eupergit C.

Soporte	Volumen de poro (mL)	Tamaño de poro (nm)	Superficie específica BET (m <sup>2</sup> /g)	Grado de epoxidación (mmol/g)	Enzima inmovilizada (%)	Carga enzimática (mg enzima/g soporte)	Actividad enzimática U/mg <sup>a</sup>	(%) <sup>b</sup>
Enzima libre	-	-	-	-	-	-	105	100
Poli(AGE-co-DVB)-74	0,55	25	97	2.0	100	10	13	12
Poli(ADGGE-co-DVB)-50	1,58	26	242	2.2	92	9,2	21	20
Poli(ATGPE-co-DVB)-13	1,22	24	208	1.2	90	9	14	13
Poli(AGE-co-DAPE-DVB)-4	1,60	20	333	0.9	100	10	47	45
Poli(ADGGE-co-DAPE-DVB)-10	0,86	19	191	0.5	100	10	48	46
Poli(ATGPE-co-DAPE-DVB)-6	1,47	22	280	0.9	51	5,1	43	41
Poli(GMA-co-EGDMA)-11	0,28	25	45	4.9	80	8	37	35
Poli(GMA-co-HDDMA)-2	0,15	26	27	4.3	100	10	80	76
Poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8	0,33	30	44	4.6	100	10	82	78
Poli(TGPMA-co-EGDMA)-9	0,29	27	44	5.3	90	9	67	64
Poli(GMA-HEMA-co-EGDMA)-9	0,27	27	34	2.9	90	9	23	22
Poli(BGMPMA-HEMA-co-EGDMA)-2	0,13	25	22	1.9	100	10	68	65
Poli(TGPMA-HEMA-co-EGDMA)-1	0,20	25	33	1.6	58	5,8	69	66
Poli(GMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1	0,29	31	38	2.4	100	10	74	70
Poli(BGMPMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1	0,09	22	17	1.7	100	10	76	72
Poli(TGPMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1	0,09	23	17	2.1	100	10	71	68
Poli(GMA-HEMA-DEAEMA-co-EGDMA)-9	0,34	28	51	2.7	100	10	61	58
Poli(TGPMA-HEMA-DEAEMA-co-EGDMA)-1	0,02	31	2,6	2,0	100	10	77	73
Poli(GE-co-DVB)-4	0,43	24	74	3.2	88	8,8	18	17
Poli(BGMPME-co-DVB)-5	0,33	22	64	2.9	75	7,5	21	20
Poli(TGPME-co-DVB)-3	0,20	23	39	4.0	100	10	26	25
Eupergit C	0,06 <sup>c</sup>	10 <sup>c</sup>	4.5 <sup>c</sup>	0,6 <sup>c</sup>	72	7,2	47	45

<sup>a</sup> Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que hidroliza 1 μmol de sustrato en las condiciones citadas en el apartado 6.3.2.3.3 de la parte experimental. La actividad específica está expresada en unidades/mg de enzima (U/mg).

<sup>b</sup> Tasa relativa de hidrólisis de p-nitrofenil-palmitato de la enzima inmovilizada respecto a la misma cantidad de enzima nativa. La actividad enzimática de la lipasa de *Pseudomonas stutzeri* libre fue 105 U/mg (100%).

<sup>c</sup> De Segura y col.<sup>532</sup>

- **Optimización de la carga enzimática en los soportes poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8 y poli(GMA-co-HDDMA)-2.**

De los resultados obtenidos, se seleccionó polímero retenía el mayor porcentaje de actividad enzimática, el poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8, y se llevó a cabo un estudio de optimización de la carga enzimática siguiendo la metodología descrita en el apartado 6.3.2.3.2. Sin embargo, cuando se llevo a cabo la aplicación este derivado inmovilizado en la resolución cinética de (R, S)-1,2-diaril-2-hidroxicetonas en las condiciones descritas en el apartado 6.4.2.1.6, se observó que el polímero poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8, se veía afectado por el disolvente empleado (metil-tetrahidrofurano), por lo que decidió probar con el polímero que había dado el segundo mejor porcentaje de actividad enzimática, el poli(GMA-co-HDDMA)-2. Con este derivado inmovilizado si se pudo llevar a cabo la aplicación, al no verse afectado por



el disolvente, por lo que también se llevo a cabo el proceso de optimización de la carga enzimática en el poli(GMA-*co*-HDDMA)-2.

En la Tabla 104 se presentan los resultados obtenidos en este proceso de optimización, y como se puede observar, se ha conseguido mejorar tanto el porcentaje de actividad retenida como la carga enzimática de los derivados inmovilizados poli(BGMPMA-*co*-EGDMA)-8 y poli(GMA-*co*-HDDMA)-2. En dicha Tabla, también se presenta un estudio comparativo con los resultados obtenidos por otros grupos de investigación.<sup>474, 475</sup>

**Tabla 104.** Resultados obtenidos en el proceso de optimización de la carga enzimática en los soportes poli (BGMPMA-*co*-EGDMA)-8 y poli (GMA-*co*-HDDMA)-2.

N°	Soporte	Carga enzimática en disolución (mg enzima/g soporte)	Carga enzimática inmovilizada (mg enzima/g soporte)	Enzima inmovilizada (%)	Actividad enzimática		
					U/mg <sup>a</sup>	(%) <sup>b</sup>	
1	Enzima libre	-	-	-	105	100	
	poli(BGMPMA- <i>co</i> -EGDMA)-8	10	10	100	82	78	
		20	16,8	84	87	83	
		30	19,2	64	74	70	
	poli(GMA- <i>co</i> -HDDMA)-2	10	10	100	80	76	
		20	15,6	78	84	80	
30		18	60	68	65		
2 <sup>474</sup>	Lip TL-SG1	10	1,9	19	-	-	
	Lip TL-SG2	10	1,8	18	-	-	
	Lip TL-SE	10	0,6	6	-	-	
	Lip TL-SS	10	7,7	77	-	-	
3 <sup>475</sup>	Butyl-sepabeads		3,46	2,14	62	-	-
		a)	8,65	5,36	62	-	-
			17,3	10,55	61	-	-
		b)	3,46	2,14	62	-	-
			8,65	5,27	61	-	-
			17,3	10,73	62	-	-
	Octadecyl-pepabeads	a)	3,46	3,25	94	-	-
			8,65	8,04	93	-	-
			17,3	15,92	92	-	-
		b)	3,46	3,18	92	-	-
			8,65	7,96	92	-	-
			17,3	15,74	91	-	-

<sup>a</sup> Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que hidroliza 1  $\mu$ mol de sustrato en las condiciones citadas en el apartado 6.3.2.3.3 de la parte experimental. La actividad específica está expresada en unidades/mg de enzima (U/mg).

<sup>b</sup> Tasa relativa de hidrólisis de p-nitrofenil-palmitato de la enzima inmovilizada respecto a la misma cantidad de enzima nativa. La actividad enzimática de la lipasa de *Pseudomonas stutzeri* libre fue 105 U/mg (100%).

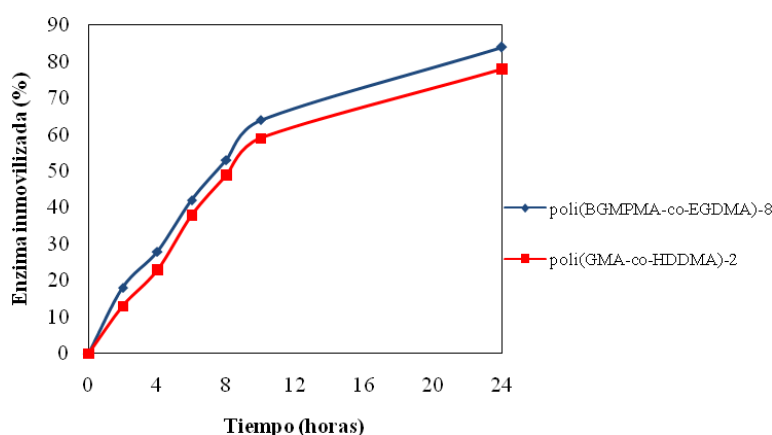
<sup>474</sup> No proporcionan datos de actividad hidrolítica.

<sup>475</sup> No proporciona datos de actividad hidrolítica. a) Sin Triton X-100, b) Con Triton X-100.

Como se observa en esta Tabla, el mejor resultado de carga enzimática (1.7%) que retiene mayor porcentaje de actividad hidrolítica (83%) ha sido obtenido con el polímero poli(BGMPMA-*co*-EGDMA)-8 empleando una disolución de 20 mg de enzima/g de soporte.

Una vez seleccionada la carga enzimática que proporción a los derivados inmovilizados la mejor actividad enzimática, se lleva a cabo la inmovilización de la lipasa de *Pseudomonas stutzeri* siguiendo el protocolo descrito en el apartado 6.3.2.3.2, con el objetivo de obtener suficiente cantidad de derivados inmovilizados para llevar a cabo las aplicaciones sintéticas.

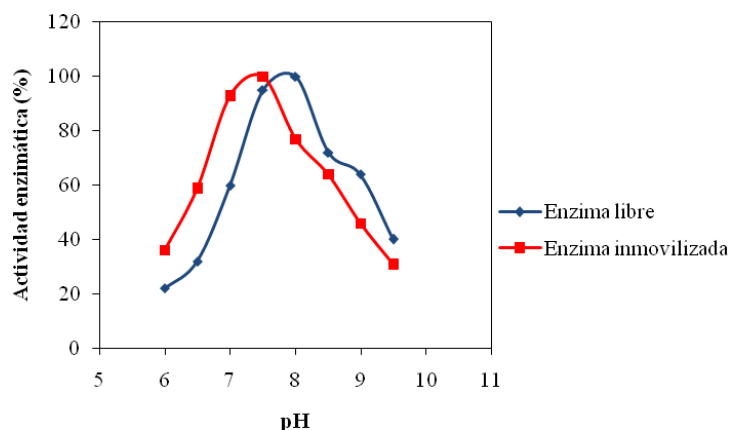
Los resultados obtenidos en cuanto a la evolución del proceso de anclaje de la enzima a los soportes seleccionados a lo largo del tiempo aparecen representados en la Figura 126. En esta Figura se puede observar que el proceso de inmovilización de la lipasa de *Pseudomonas stutzeri* en los dos polímeros seleccionados presenta un perfil muy parecido. Con el polímero poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8 el proceso de inmovilización enzimática es más rápido y permite obtener un derivado inmovilizado que presenta mayor carga enzimática y mayor porcentaje de actividad enzimática que el derivado inmovilizado obtenido con el poli(GMA-co-HDDMA)-2.



**Figura 126.** Evolución del anclaje enzimático durante el proceso de inmovilización de lipasa de *Pseudomonas stutzeri* sobre poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8 y poli(GMA-co-HDDMA)-2.

- **Efecto del pH en la actividad catalítica de la enzima libre y del derivado poli (BGMPMA-co-EGDMA)-8.**

Se realizó un estudio de la influencia que tiene el pH en la actividad enzimática de la lipasa de *Pseudomonas stutzeri*, tanto libre como inmovilizada en los polímeros poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8 y poli(GMA-co-HDDMA)-2, siguiendo la metodología descrita en el apartado 6.3.2.3.3 En la Figura 127 se pueden observar los resultados obtenidos en este estudio. Como se puede ver, el pH óptimo para la enzima inmovilizada (pH 7.5) es un poco inferior al de la enzima libre (pH 8.0). Este fenómeno debe presumiblemente a cambios en el  $pK_a$  de residuos funcionales de la enzima.

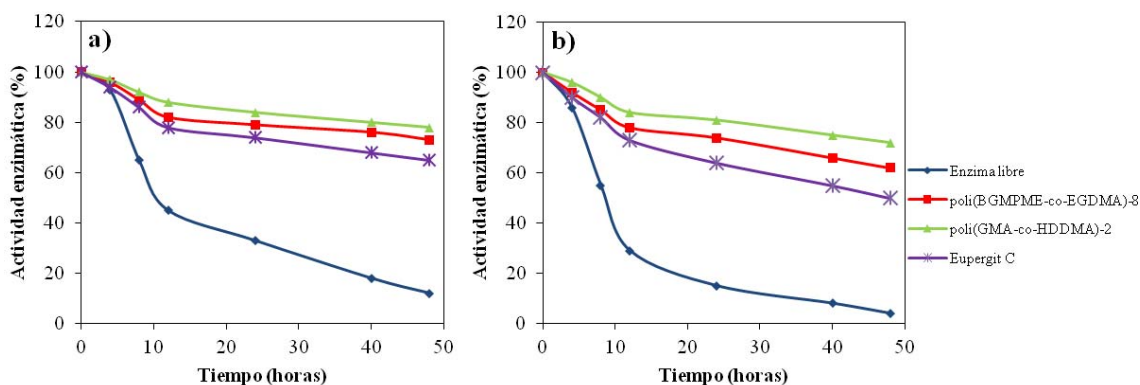


**Figura 127.** Influencia del pH en la actividad enzimática de la lipasa TL de *Pseudomonas stutzeri* libre e inmovilizada sobre los polímeros poli(BGMPMA-*co*-EGDMA)-8 y poli(GMA-*co*-HDDMA)-2.

- **Estabilidad térmica de la enzima libre y de los derivados poli(BGMPMA-*co*-EGDMA)-8 y poli(GMA-*co*-HDDMA)-2.**

Con el objetivo de verificar la estabilidad que proporciona el proceso de inmovilización a la lipasa de *Pseudomonas stutzeri* en los polímeros poli(BGMPMA-*co*-EGDMA)-8 y poli(GMA-*co*-HDDMA)-2, se llevó a cabo un estudio de termo estabilidad de la enzima libre e inmovilizada a dos temperaturas, 37°C (Figura 128-a) y 50°C (Figura 128-b), siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.3.2.3.3 En la Figura 128 se presentan los resultados obtenidos en este estudio, incluyéndose la comparativa con un soporte comercial, el Eupergit C. Como se puede observar en la Figura 128-a, el enzima libre pierde el 50 % de su actividad a las 10 horas y mantiene el 12 % de su actividad tras 48 horas a 37°C. Por su parte, los derivados con poli(BGMPMA-*co*-EGDMA)-8, poli(GMA-*co*-HDDMA)-2 y Eupergit mantienen respectivamente el 73 %, 78 % y el 55 % de su actividad a las 48 horas. A 50 °C (Figura 128-b) el comportamiento es similar, en este caso el enzima libre pierde el 50 % de su actividad a las 8 horas y mantiene el 4 % de su actividad tras 48 horas, y los derivados con poli(BGMPMA-*co*-EGDMA)-8, poli(GMA-*co*-HDDMA)-2 y Eupergit mantienen respectivamente el 62 %, 72 % y el 50 % de su actividad a las 48 horas. Todos estos datos indican que el proceso de inmovilización en los polímeros poli (BGMPME-*co*-DVB)-5 y poli(GMA-*co*-HDDMA)-2, le confieren a la enzima una gran estabilidad, superior a la que le confiere el soporte comercial (Eupergit C).

Estudios previos, sobre la inmovilización de esta enzima, publicados por otros grupos de investigación,<sup>475</sup> han proporcionado datos de estabilidad térmica, en diferentes disolventes, y sus mejores datos son similares a los datos obtenidos en esta memoria (80% de retención de actividad enzimática a 50°C en 24 horas).

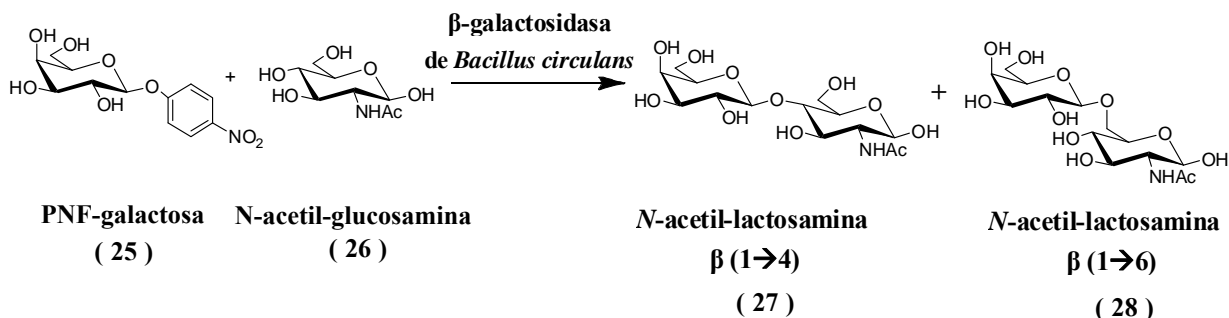


**Figura 128.** Estabilidad térmica de la lipasa de *Pseudomonas stutzeri*, libre e inmovilizada sobre poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8, poli(GMA-co-HDDMA)-2 y Eupergit C, a dos temperaturas: a) 37°C y b) 50°C.

## 5.5. Aplicaciones de los Biocatalizadores.

### 5.5.1. Aplicaciones de las glicosidasas.

#### 5.5.1.1. Síntesis enzimática de *N*-acetil-lactosamina (Gal-β-(1→4)-GlcNAc) (27) con β-galactosidasa de *Bacillus circulans* (Biolacta).



**Esquema 64.** Síntesis de *N*-acetil-lactosamina con β-galactosidasa de *Bacillus circulans* libre e inmovilizada sobre poli(AGE-co-DVB)-74.

El empleo de las glicosidasas en la síntesis de oligosacáridos presentan muchas ventajas, especialmente en lo que se refiere a la regio- y estereoselectividad del proceso.

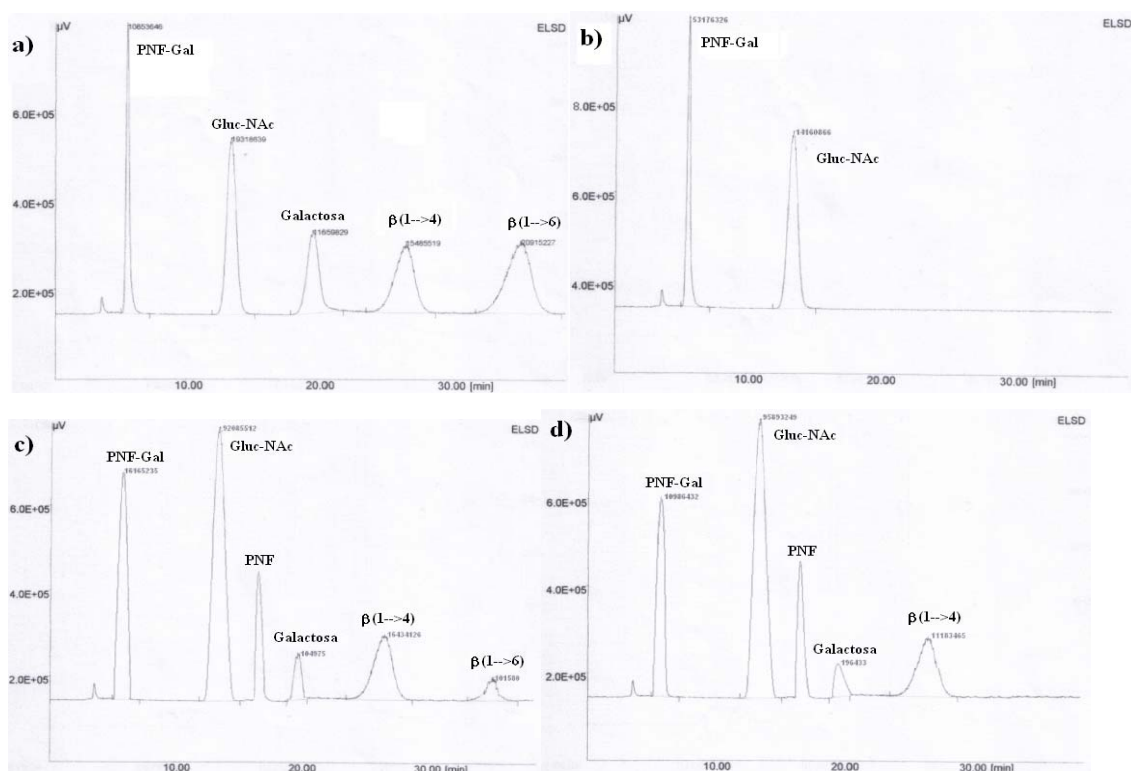
En primer lugar se llevó a cabo la reacción de transglicosidación con el enzima libre y para ello se utilizó *p*-nitrofenol-β-D-galactosa (PNF-β-Gal) como donador y *N*-acetil-glucosamina (GlcNAc) como aceptor. Se empleó un monosacárido acetilado (GlcNAc) como sustrato aceptor debido a que Zeng y col.<sup>537</sup> demostraron que en reacciones de transglicosidación catalizadas por la β-galactosidasa de *Bacillus circulans*, los monosacáridos *N*-acetilados son mejores aceptores que los monosacáridos sin modificar.

Las condiciones de reacción empleadas en la síntesis enzimática de *N*-acetil-lactosamina catalizada por la β-galactosidasa de *Bacillus circulans*, se seleccionaron en base a los resultados

obtenidos en estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación con la misma enzima<sup>538, 539</sup> y los resultados obtenidos en dicha síntesis aparecen en la Figura 129. En dicha Figura puede observarse que se obtuvo mayoritariamente el producto  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) (31%) frente al producto  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) (4%), resultados muy similares a los obtenidos en otros trabajos de investigación.<sup>211, 538, 539</sup>

Tras el estudio de inmovilización de esta  $\beta$ -galactosidasa sobre diferentes polímeros y su caracterización se seleccionó el derivado poli(AGE-co-DVB)-74, ya que era el que retenía el mayor porcentaje de actividad enzimática, para llevar a cabo la síntesis enzimática de *N*-acetil-lactosamina siguiendo el procedimiento experimental descrito en el apartado 6.4.1.1.

Se estudio la influencia del proceso de inmovilización sobre la reacción de transglucosidación siguiendo en procedimiento que aparece en el apartado 6.4.1.1. La evolución de las reacciones se llevó a cabo mediante el análisis de muestras tomadas a diferentes tiempos en HPLC. En la Figura 129 se pueden observar los cromatogramas obtenidos al inicio y al final del proceso de la síntesis enzimática de *N*-acetil-lactosamina.

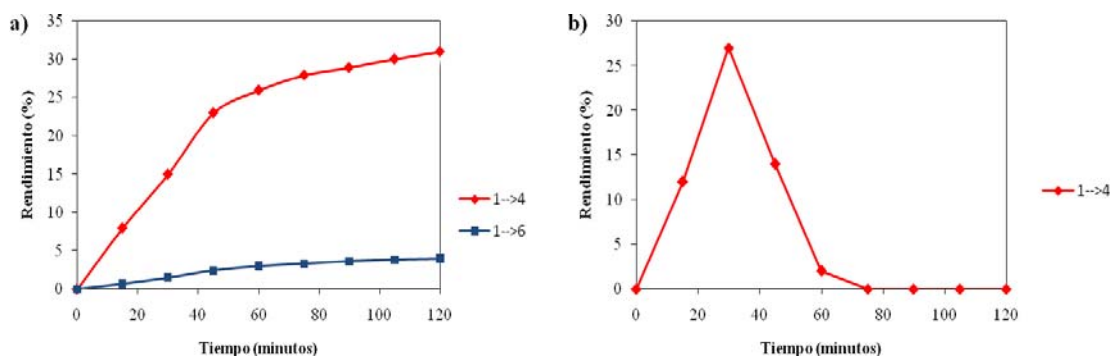


**Figura 129.** Cromatogramas de la síntesis enzimática de *N*-acetil-lactosamina. a) Patrones. b) Síntesis enzimática de *N*-acetil-lactosamina a  $t=0$  min. c) Síntesis enzimática de *N*-acetil-lactosamina con la enzima libre a  $t=120$  min. d) Síntesis enzimática de *N*-acetil-lactosamina con la enzima inmovilizada a  $t=30$  min.

Como se puede observar en la Figura 130, el proceso de inmovilización aumenta la regioselectividad de la síntesis de *N*-acetil-lactosamina, convirtiéndose en una reacción 100% regio selectiva.

Como podemos observar en la Figura 131-a, con la enzima libre se obtiene un rendimiento máximo de isómero  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) del 31% y un 4% del isómero  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) a los 120

minutos de reacción. En el caso de la enzima inmovilizada sobre poli(AGE-co-DVB)-74 (Figura 131-b), el rendimiento es menor, un 27%, pero la regioselectividad es mayor y el tiempo de reacción disminuye hasta los 30 minutos, por lo que la productividad aumenta considerablemente. A su vez se puede observar que la enzima inmovilizada inicialmente posee mayoritariamente un comportamiento sintético y posteriormente hidroliza el producto sintetizado.



**Figura 130.** Síntesis enzimática de *N*-acetil-lactosamina: a) Enzima libre; b) Enzima inmovilizada sobre poli(AGE-co-DVB)-74 .

Con el objetivo de caracterizar el producto obtenido en esta síntesis enzimática, se realizó una columna cromatográfica empleando como fase estacionaria carbón activo y celite 535 Coarse en porciones 1/1 (v/v). Una vez purificado el producto se determinó su estructura por diferentes técnicas espectroscópicas de RMN mono dimensionales: RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C. La asignación de las señales del espectro de RMN-<sup>1</sup>H y del espectro de RMN-<sup>13</sup>C, aparecen en la Parte Experimental. Estos experimentos confirman la regioselectividad de la reacción enzimática

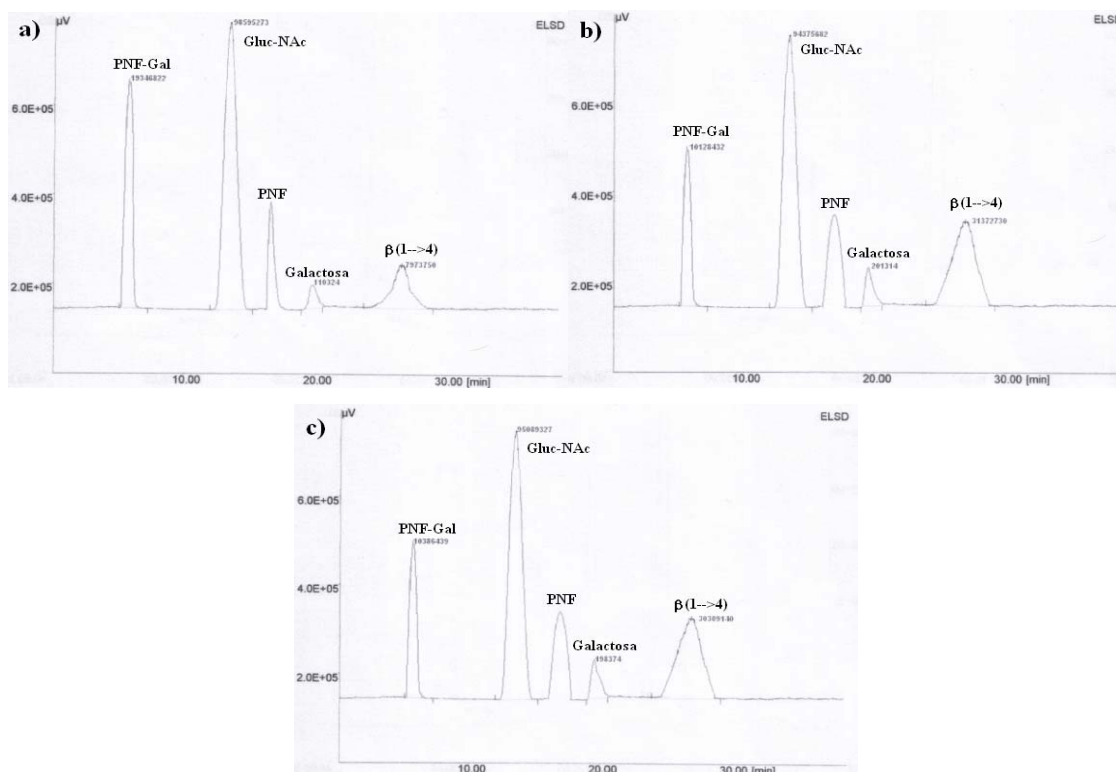
#### 5.5.1.1.1. Síntesis enzimática de *N*-acetil-lactosamina con $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans* (Biolacta) en presencia de disolventes sostenibles.

A continuación se llevó a cabo la reacción de transglucosidación en presencia de diferentes disolventes sostenibles. En nuestro grupo de investigación se había realizado un estudio exhaustivo de la influencia de diferentes disolventes sostenibles en la actividad sintética de esta  $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans* (Tabla 105),<sup>538, 539</sup> por lo que las condiciones óptimas de reacción ya estaban puestas a punto.

- **Disolventes provenientes de biomasa.**

Basándonos en los resultados obtenidos en estudios previos,<sup>538, 539</sup> se seleccionaron 3 disolventes verdes 2-hidroxi-N,N-dimetilpropanamida (DMA1), 1-isopropoxi-3-(2,2,2-trifluoroetoxi) propan-2-ol (GC7), y 1,3-bis(2,2,2-trifluoroetanol)propan-2-ol (GC8) para estudiar la influencia de dichos disolventes sostenibles en la síntesis enzimática de *N*-acetil-

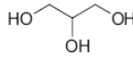
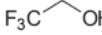
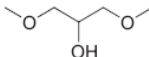
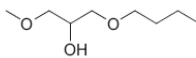
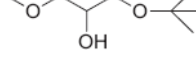
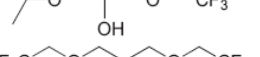
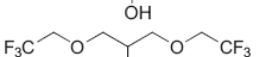
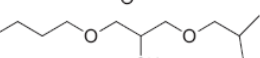
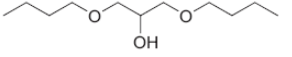
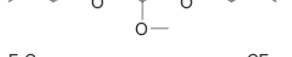
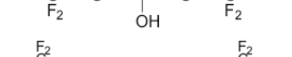
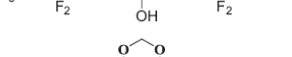
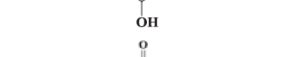
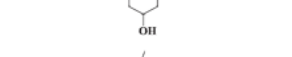
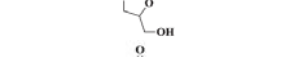
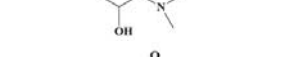
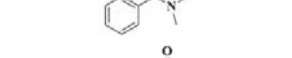


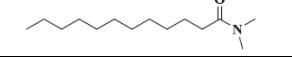
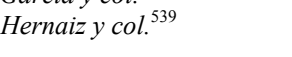

lactosamina catalizada por la  $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans* (Biolacta) inmovilizada sobre poli(AGE-co-DVB)-74. Este estudio se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en el apartado 6.4.1.1.1 de la parte experimental. La evolución de las reacciones se llevó a cabo mediante el análisis de muestras tomadas a diferentes tiempos en HPLC (Figura 131). Los resultados obtenidos en este estudio aparecen reflejados en la Tabla 87, en la que aparece un estudio comparativo con los resultados obtenidos previamente con la enzima libre,<sup>538, 539</sup> y en la Figura 132, en la que puede observarse el progreso de las reacciones llevadas a cabo con la enzima inmovilizada.



**Figura 131.** Cromatogramas de la reacción de síntesis de *N*-acetil-lactosamina con la  $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans* inmovilizada sobre poli(AGE-co-DVB)-74. a) **DMA1** a  $t=15$  min. b) **GC7** a  $t=90$  min. c) **GC8** a  $t=15$  min.

Como se puede ver en la Tabla 105, no se observó un comportamiento regular en la influencia de los disolventes verdes sobre la regioselectividad de la síntesis de *N*-acetil-lactosamina catalizada por la  $\beta$ -galactosidasa de *B. circulans* libre, mientras que con la enzima inmovilizada sobre poli(AGE-co-DVB)-74 se observó una regioselectividad del 100% por el producto  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) en todos los casos, presentando la misma regioselectividad que empleando una disolución tampón fosfato sódico. Comparando los resultados obtenidos con la enzima inmovilizada frente a la enzima libre, en las mismas condiciones, se observa que con la enzima inmovilizada sobre poli(AGE-co-DVB)-74 se obtenía una completa regioselectividad por el producto  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) (mismo comportamiento en solución tampón que en disolventes sostenibles), mientras que con la enzima libre, los disolventes sostenibles dieron lugar a un cambio de regioselectividad (producto mayoritario o exclusivo  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) frente a la disolución tampón).

**Tabla 105.** Influencia de los disolventes verdes en la regioselectividad de la síntesis enzimática de *N*-acetil-lactosamina catalizada por la  $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans* libre<sup>538, 539</sup> e inmovilizada sobre poli(AGE-co-DVB)-74.

Disolvente verde	log P <sup>a,b</sup>	$\mu(D)^{a,b}$	Enzima	<i>N</i> -acetil-lactosamina $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) (%)	<i>N</i> -acetil-lactosamina $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) (%)
<b>Tampón fosfato sódico</b>	-	-	libre	89	11
			inmovilizada	100	0
	-1.33	-	libre	61	39
			inmovilizada	-	-
	0.71	2.64	libre	100	0
			inmovilizada	-	-
	-0.60	3.00	libre	15	85
			inmovilizada	-	-
	0.14	2.40	libre	23	77
			inmovilizada	-	-
	0.27	2.36	libre	13	87
			inmovilizada	-	-
	1.14	3.36	libre	0	100
			inmovilizada	100	0
	1.42	4.10	libre	0	100
			inmovilizada	100	0
	1.71	4.20	libre	0	100
			inmovilizada	-	-
	1.93	2.30	libre	17	83
			inmovilizada	-	-
	2.07	2.40	libre	0	100
			inmovilizada	-	-
	2.48	2.20	libre	23	77
			inmovilizada	-	-
	2.56	3.94	libre	0	100
			inmovilizada	-	-
	3.77	3.90	libre	0	0
			inmovilizada	-	-
	-0.57	1.23	libre	9	91
			inmovilizada	-	-
	-0.24	1.40	libre	65	35
			inmovilizada	-	-
	0.03	1.06	libre	29	71
			inmovilizada	-	-
	-0.69	1.06	libre	9	91
			inmovilizada	100	0
	1.41	1.14	libre	87	13
			inmovilizada	-	-
	1.42	0.90	libre	24	76
			inmovilizada	-	-
	2.25	0.88	libre	0	0
			inmovilizada	-	-
	3.09	0.87	libre	0	0
			inmovilizada	-	-
	3.92	0.89	libre	0	0
			inmovilizada	-	-

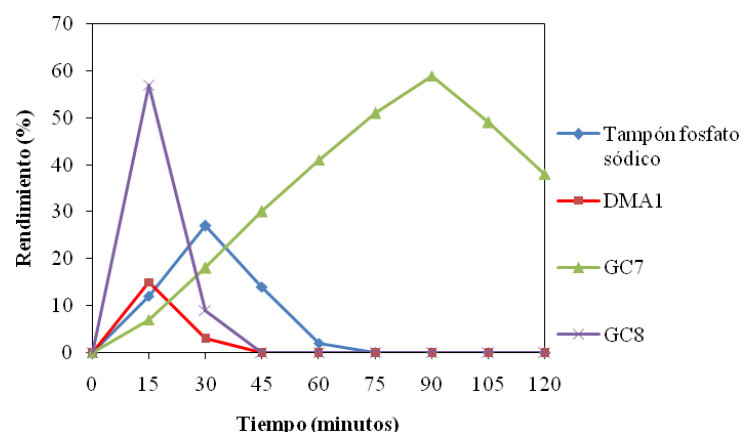
<sup>a</sup> García y col.<sup>540</sup>

<sup>b</sup> Hernaiz y col.<sup>539</sup>



Hernaiz y col.<sup>538</sup> explicaron el cambio de regioselectividad de la enzima libre en presencia de disolventes verdes realizando un estudio de modelado molecular, con *S. pneumoniae* como base, en el que observaron que la disposición tridimensional de la mezcla de *N*-acetil-glucosa (GlcNAc) y disolventes sostenibles favorecía la formación de producto  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6). Esta disposición también se estabiliza por la interacción entre el OH de la Ser-648 y O4 de GlcNAc, lo que también explica la disminución del porcentaje de producto  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). Teniendo en cuenta este estudio y los resultados obtenidos en esta memoria, podría explicarse la retención de la regioselectividad de la enzima inmovilizada en presencia de disolventes sostenibles debido a cambios estructurales conformacionales o rigidificación de la disposición estructural de la enzima en el proceso de inmovilización.

Analizando la Figura 132, se puede ver que no existe un comportamiento regular en la influencia de los disolventes verdes sobre conversión obtenida en la síntesis enzimática de *N*-acetil-lactosamina. El disolvente DMA 1, da lugar a un menor rendimiento (15%) que la disolución tampón (27%), pero la síntesis es más rápida (15 minutos con DMA1 frente a 30 minutos con solución tampón). Con los dos disolventes derivados del glicerol, GC7 y GC8, se obtienen mayores rendimientos, 59% y 57% respectivamente, aunque difieren en el tiempo de reacción óptimo que para el GC8 (15 minutos) es mucho menor que para el GC7 (90 minutos). A su vez, se puede observar que la enzima inmovilizada inicialmente posee mayoritariamente un comportamiento sintético y posteriormente hidroliza el producto sintetizado.



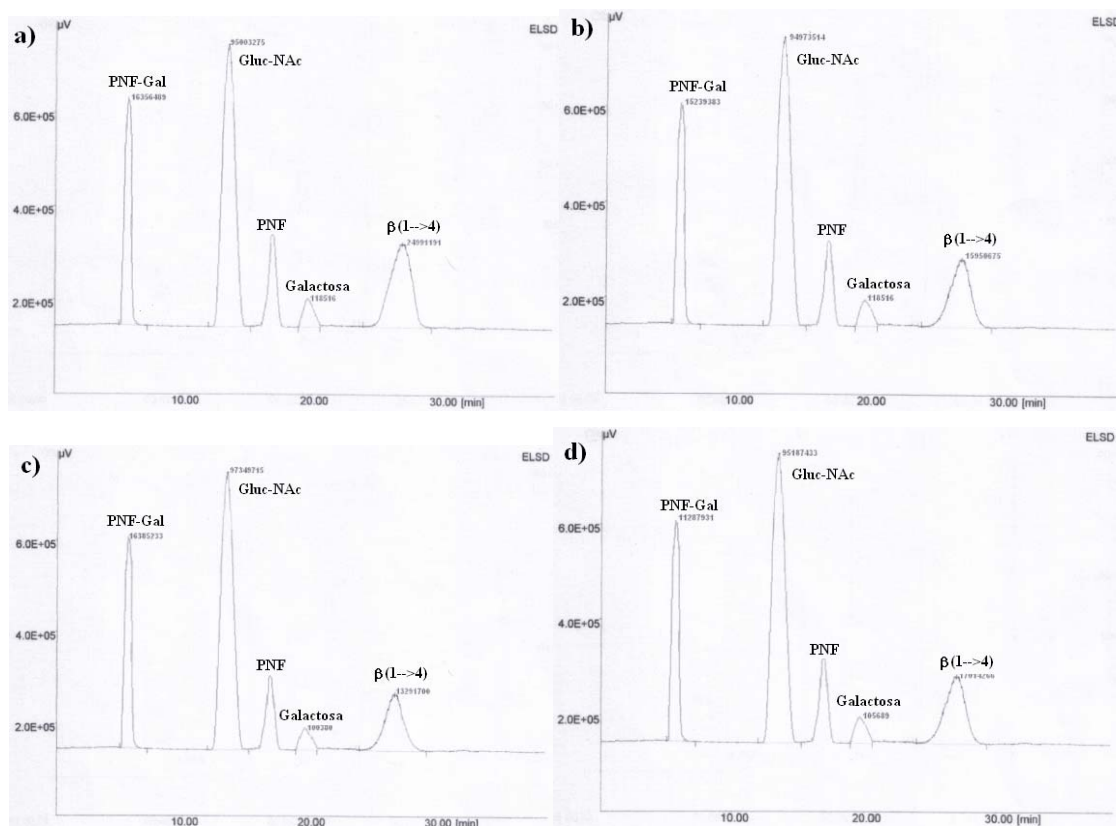
**Figura 132.** Resultados obtenidos en la síntesis de *N*-acetil-lactosamina en diferentes disolventes catalizada por la  $\beta$ -galactosidasa de *B. circulans* inmovilizada sobre poli (AGE-*co*-DVB)-74.

- **Líquidos iónicos.**

Se ha realizado un estudio de la influencia de los líquidos iónicos, como *co*-disolventes, sobre la reacción de glicosidación. Este estudio se llevó a cabo empleando líquidos iónicos asequibles comercialmente que han sido ampliamente empleados por diversos grupos de investigación<sup>363, 366, 370, 541-544</sup> y líquidos iónicos proporcionados por el Prof. Dr. Pedro Lozano del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular e Inmunología de la Facultad de

Química de la Universidad de Murcia. Fueron testados cuatro líquidos iónicos: Bis-triflimida de trioctil metilamonio [Troma] [ $\text{Tf}_2\text{N}$ ], hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio [Bmin] [ $\text{PF}_6$ ], Fluoroaminofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio [Bmin] [PAF] y Tetrafluoroborato de 1-etil-3-metilimidazolio [Emin] [ $\text{BF}_4$ ], y las condiciones de reacción se seleccionaron teniendo en cuenta los resultados obtenidos con glicosidasas por otros grupos de investigación.<sup>370, 541-544</sup>

Este estudio se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en el apartado 6.4.1.1.1 de la parte experimental. La evolución de las reacciones se llevó a cabo mediante el análisis de muestras tomadas a diferentes tiempos en HPLC (Figura 134). Los resultados obtenidos en este estudio aparecen en la Tabla 106. En la Figura 133 se pueden observar los cromatogramas finales del proceso de la síntesis enzimática de *N*-acetil-lactosamina.



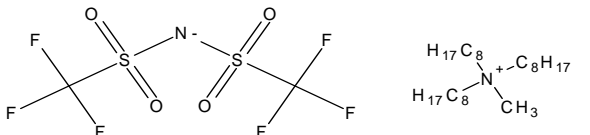
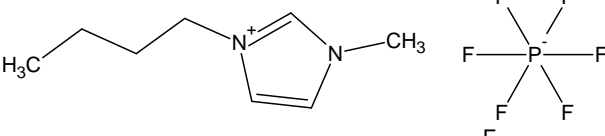
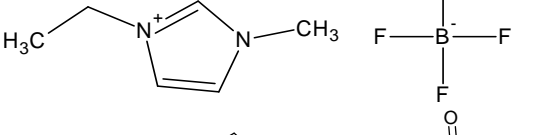
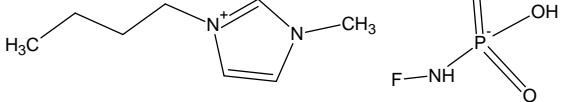
**Figura 133.** Cromatogramas de la síntesis enzimática de *N*-acetil-lactosamina. a) [Toma] [ $\text{Tf}_2\text{N}$ ] a  $t = 90$  min. b) [Bmin] [ $\text{PF}_6$ ] a  $t = 90$  min. c) [Bmin] [PAF] a  $t = 90$  min. d) [Emin] [ $\text{BF}_4$ ] a  $t = 90$  min.

Como puede observarse en la Figura 133, el empleo de líquidos iónicos en la síntesis enzimática de *N*-acetil-lactosamina no produce cambios en la regioselectividad respecto al proceso catalítico en disolución tampón, obteniéndose como único producto el  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4).

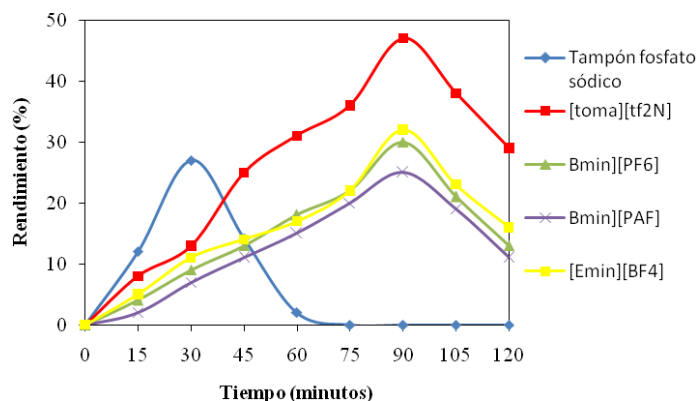
Como se puede observar en la Tabla 106 y en la Figura 134, en general, todos los líquidos iónicos ralentizaron la síntesis de *N*-acetil-lactosamina. Este fenómeno puede ser debido a una disminución de la difusión de sustratos al centro activo de la enzima, originada por el aumento de la viscosidad del medio de reacción.<sup>370</sup> Los rendimientos obtenidos empleando líquidos iónicos, [Troma] [ $\text{Tf}_2\text{N}$ ] (47%), [Bmin] [ $\text{PF}_6$ ] (30%), [Emin] [ $\text{BF}_4$ ] (32%), han sido superiores

que los obtenidos en disolución tampón (27%), excepto con [Bmin] [PAF] (25%). El aumento de la conversión obtenido gracias al empleo de los diferentes líquidos iónicos puede ser relacionado con un descenso de la actividad de agua ( $a_w$ ), debido a la interacción del líquido iónico con el agua, que condiciona la tasa de hidrólisis secundaria del producto, como observaron *Kaftzik y col.* en 2002.<sup>370</sup> El aumento de conversión también puede ser atribuido a la interacción de los componentes de los líquidos iónicos con grupos cargados situados en o cerca del centro activo de la enzima.<sup>370</sup>

**Tabla 106.** Influencia de los líquidos iónicos en la síntesis enzimática de *N*-acetil-lactosamina catalizada por la  $\beta$ -galactosidasa de *B. circulans* inmovilizada sobre poli(AGE-co-DVB)-74.

Líquido iónico	Estructura	Conversión $\beta(1\rightarrow4)$ (%)	Conversión $\beta(1\rightarrow6)$ (%)
Tampón fosfato		27	0
[Troma][Tf <sub>2</sub> N]		47	0
[Bmin][PF <sub>6</sub> ]		30	0
[Emin][BF <sub>4</sub> ]		32	0
[Bmin][PAF]		25	0

Como puede observarse en la Figura 134, la enzima inmovilizada presentó inicialmente un comportamiento sintético, alcanzándose la máxima conversión a los 90 min, y posteriormente comenzó a hidrolizar el producto sintetizado.



**Figura 134.** Resultados obtenidos en la síntesis de *N*-acetil-lactosamina, empleando diferentes líquidos iónicos, catalizada por la  $\beta$ -galactosidasa de *B. circulans* inmovilizada sobre poli(AGE-co-DVB)-100.

- **Estudio comparativo de la influencia de los diferentes medios de reacción sobre la síntesis enzimática de *N*-acetil-lactosamina catalizada por la  $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans* (Biolacta) inmovilizada.**

En la Tabla 107 se presenta un estudio comparativo de la influencia de los diferentes medios de reacción sobre la síntesis enzimática de *N*-acetil-lactosamina. En esta Tabla, también se han incluido los resultados obtenidos por otros autores<sup>211</sup> con la enzima inmovilizada en un soporte comercial. Como se puede observar en esta Tabla, en este trabajo de investigación se ha mejorado significativamente las productividades obtenidas por otros autores<sup>211</sup> con un soporte comercial debido a un aumento del rendimiento de reacción, una disminución en el tiempo de reacción ó por combinación de los dos factores. De estos resultados cabe destacar el obtenido con el disolvente sostenible derivado del glicerol, GC8, con el cual se mejora la productividad en un orden de magnitud.

**Tabla 107.** Estudio comparativo de la influencia de los diferentes medios de reacción sobre la síntesis enzimática de *N*-acetil-lactosamina.

Medio de reacción	Rendimiento (%)	Tiempo de reacción (min)	Productividad (mmol/h mg enzima)
Enzima libre (tampón fosfato)	31	120	$1.0 \times 10^{-3}$
Tampón fosfato sódico	27	30	$3.7 \times 10^{-3}$
DMA 1	15	15	$4.1 \times 10^{-3}$
GC 7	59	90	$2.7 \times 10^{-3}$
GC 8	57	15	$1.6 \times 10^{-2}$
[Troma] [Ntf <sub>2</sub> N]	47	90	$2.2 \times 10^{-3}$
[Bmin][PF <sub>6</sub> ]	30	90	$1.4 \times 10^{-3}$
[Bmin][PAF]	25	90	$1.1 \times 10^{-3}$
[Emin][BF <sub>4</sub> ]	32	90	$1.5 \times 10^{-3}$
Eupergit C (tampón fosfato) <sup>a</sup>	36	120	$1.1 \times 10^{-3}$

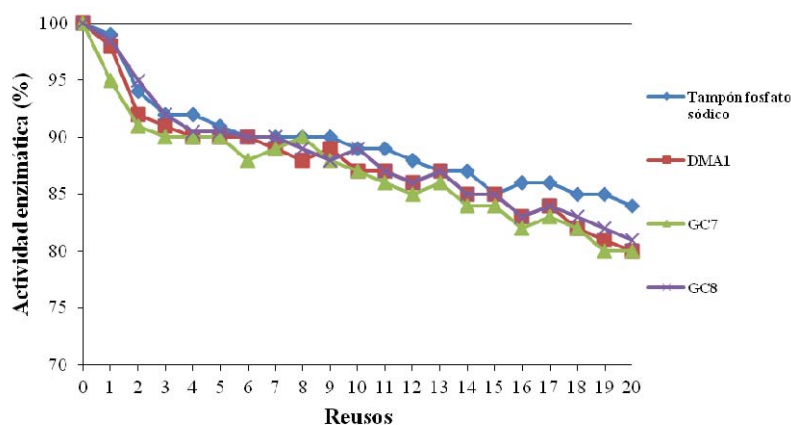
<sup>a</sup> Hernáiz y col.,<sup>211</sup>

#### 5.5.1.1.2. Reutilización de la $\beta$ -galactosidasa de *B. circulans* (Biolacta) inmovilizada sobre poli(AGE-co-DVB)-74 en la síntesis de *N*-acetil-lactosamina.

Una de las principales ventajas a la hora de utilizar enzimas inmovilizadas es que pueden ser re-utilizadas en varios ciclos y esto es de vital importancia para el escalado industrial. Por ello también se realizó un estudio sobre la reutilización de la  $\beta$ -galactosidasa de *B. circulans* inmovilizada sobre poli(AGE-co-DVB)-74 en la síntesis de *N*-acetil-lactosamina, en tampón y en presencia de los diferentes disolventes sostenibles (DMA1 (2mM), GC7 (2mM), GC8 (2mM), [Troma] [Tf<sub>2</sub>N] (30%), [Bmin] [PF<sub>6</sub>] (30%), [Emin] [BF<sub>4</sub>] (30%) y [Bmin] [PAF] (30%)), siguiendo el protocolo descrito en el apartado 6.4.1.1.2 de la parte experimental. Los resultados obtenidos con los disolventes provenientes de biomasa aparecen reflejados en la Figura 135. Con los líquidos iónicos resulto imposible realizar reúsos debido a que el LI quedó

atrapado en el derivado inmovilizado y no pudo ser eliminado tras los lavados llevados a cabo con disolución tampón y agua destilada.

Como se puede observar en esta Figura, estos derivados enzimáticos inmovilizados poseen una gran estabilidad y por lo tanto una gran reusabilidad, con un pérdida de actividad entre el 16-20% tras 20 reúsos. Estos resultados mejoran considerablemente los publicados previamente empleando un soporte comercial (Eupergit C),<sup>211</sup> en el que tras el tercer reuso el derivado inmovilizado había perdido el 20% de su actividad inicial.



**Figura 135.** Reutilización de la  $\beta$ -galactosidasa de *B. circulans* inmovilizada sobre poli(AGE-co-DVB)-74 en la síntesis de *N*-acetil-lactosamina.

## 5.5.2. Aplicaciones de las lipasas.

### 5.5.2.1. Resoluciones cinéticas de alcoholes secundarios.

Pese a los grandes avances en síntesis asimétrica, una de las metodologías más empleadas para la obtención de compuestos enantioméricamente puros es la resolución cinética (KR) de mezclas racémicas. La utilización de enzimas en procesos de resoluciones cinéticas es una herramienta cada vez más utilizada en química orgánica,<sup>118</sup> en concreto, las lipasas son los biocatalizadores más empleados en la resolución cinética de alcoholes, ésteres, ácidos y aminas.<sup>85</sup> Se decidió realizar un estudio del comportamiento de diferentes enzimas frente a sustratos de diferentes dimensiones y diferencias de tamaño de los sustituyentes alrededor del estereocentro.

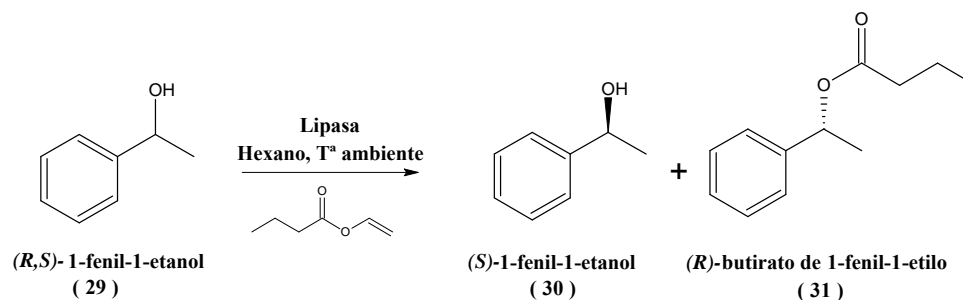
De los derivados inmovilizados obtenidos en los procesos de inmovilización de las lipasas de *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas cepacia* y *Pseudomonas stutzeri* sobre los polímeros sintetizados en esta memoria, se seleccionaron aquellos que retenían una mayor actividad enzimática para llevar a cabo la resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-1-etanol, (*R*, *S*)-1-fenil-1-propanol, (*R*, *S*)-1-fenil-2-propanol, (*R*, *S*)-1-fenil-2-pentanol, (*R*, *S*)-1-(1-naftil)etanol y una serie de (*R*, *S*)-1,2-diaril-2-hidroxi-etnanonas siguiendo los procedimientos experimentales descritos en el apartado 6.4.2.1.

Para llevar a cabo estas resoluciones cinéticas se eligió como disolvente estándar el *n*-hexano debido a que es asequible comercialmente y ha sido un disolvente previamente empleado por otros grupos de investigación en reacciones de resolución cinética catalizadas por lipasas.<sup>435, 438, 441, 444, 469, 545</sup>

También se llevo a cabo un estudio de la influencia de los disolventes sostenibles en los procesos de resolución cinética de alcoholes secundarios catalizados por las lipasas. En este caso, se sustituyeron los disolventes derivados de biomasa empleados con la  $\beta$ -galactosidasa de *B. circulans* (1-isopropoxi-3-(2,2,2-trifluoroetoxi)propan-2-ol (GC7), 1,3-bis(2,2,2-trifluoroetoxi)propan-2-ol (GC8) y 2-hidroxi-*N,N*-dimetilpropanamida (DMA1)), que poseían grupos funcionales alcohol libres que podían interferir en el proceso de resolución cinética de alcoholes secundarios, por otros que no tuvieran alcoholes libre: 2-metoxi-1,3-bis(2,2,2-trifluoroetoxi)propano (GC9), 1-(3-butoxi-2-metoxipropoxi)butano (GC12), *N,N*-dimetilhexanamida (DMA3), *N,N*-dimetil octanamida (DMA4), *N,N*-dimetildecanamida (DMA5), *N,N*-dimetildodecanamida (DMA6). También se emplearon tres líquidos iónicos asequibles comercialmente que han sido empleados previamente por otros grupos de investigación: [Bmin] [PF<sub>6</sub>], [Emin] [BF<sub>4</sub>] y [Bmin] [PAF].<sup>435, 448, 546-549</sup>

Este estudio sobre la influencia de los disolventes sostenibles en los procesos de resolución cinética de alcoholes secundarios catalizados por las lipasas sólo se va a llevar a cabo empleando dos sustratos patrón: (*R, S*)-1-fenil-1-etanol y (*R, S*)-1,2-difenil-2-hidroxietanona.

#### 5.5.2.1.1. Resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol (29).



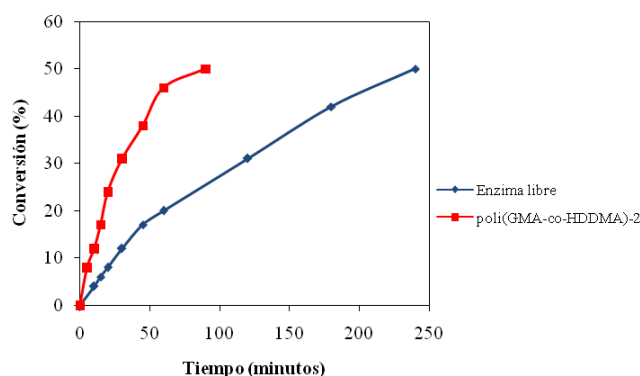
**Esquema 65.** Resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol catalizada por lipasas.

El (*R, S*)-1-fenil-1-etanol es uno de los compuestos más utilizados como sustrato patrón en procesos de resolución cinética y cinética-dinámica de alcoholes secundarios.<sup>124, 134, 149, 428, 431, 436-449, 456-459</sup> Por ello se decidió empezar con este sustrato, ya que es el más sencillo.

#### 5.5.2.1.1.1. Resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol con lipasa de *Pseudomonas fluorescens*.

Se realizó un estudio comparativo de la resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol entre la enzima libre, 21 mg de preparado enzimático (0.25 mg de enzima, 611Umg<sup>-1</sup>) y la

enzima inmovilizada, 10 mg poli(GMA-*co*-HDDMA)-2 (0.12 mg de enzima, 519 U mg<sup>-1</sup>), llevando a cabo el procedimiento experimental descrito en el apartado 6.4.2.1.1.1. Los resultados obtenidos en este estudio se pueden observar en la Figura 136.



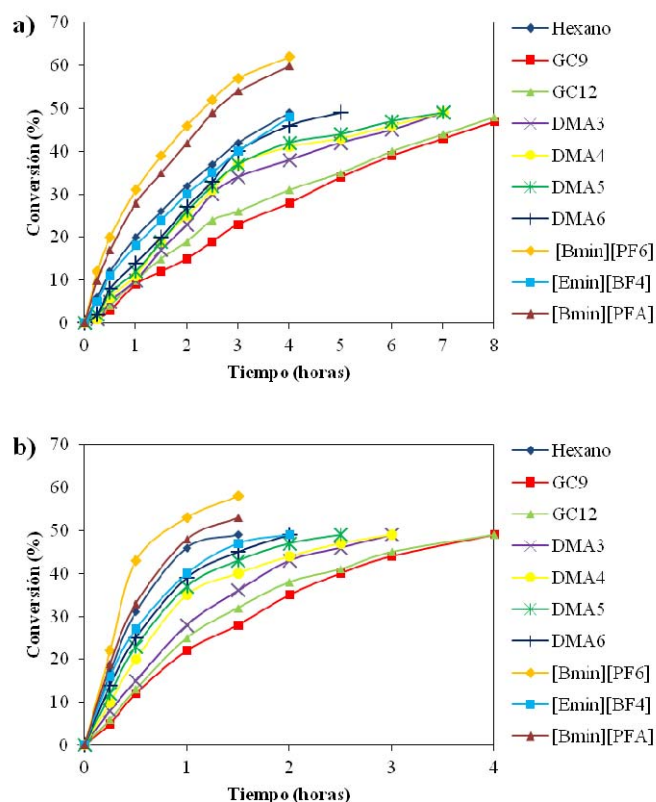
**Figura 136.** Progreso de la resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-1-etanol catalizada por la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* libre e inmovilizada sobre poli(GMA-*co*-HDDMA)-2.

Como se puede observar en esta Figura, el proceso de resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-1-etanol con la enzima inmovilizada resultó mucho más rápido que con la enzima libre. Este fenómeno podría ser debido a que el proceso de inmovilización enzimática evita la formación de agregados de intermoleculares de enzimas, en presencia de disolventes orgánicos, al mantener las moléculas de enzima retenidas en una determinada región del espacio y proporciona una mayor resistencia frente a la desactivación por efecto de disolventes orgánicos al tener estabilizada su estructura terciaria.<sup>33, 429</sup> También podría ser debido a un fenómeno de hiperactivación originado por la estabilización de la conformación abierta de la lipasa (conformación con la tapa abierta) durante el proceso de inmovilización.<sup>550-553</sup>

#### 5.5.2.1.1.1. Resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-1-etanol con lipasa de *Pseudomonas fluorescens* en presencia de disolventes sostenibles.

Se estudió la influencia de los disolventes sostenibles en el proceso de resolución cinética del (*R*, *S*)-1-fenil-1 etanol siguiendo el procedimiento experimental descrito en el apartado 6.4.2.1.1.1.1. Para ello se emplearon mezclas de *n*-hexano 2 mM de disolventes provenientes de biomasa (GC9, GC12, DMA4, DMA5 y DMA6), y mezclas de de *n*-hexano al 30% en líquido iónico ([Bmin] [PF<sub>6</sub>], [Emin] [BF<sub>4</sub>] y [Bmin] [PAF]), condiciones de concentración de disolventes sostenibles que fueron anteriormente empleadas en el caso de la síntesis enzimática de *N*-acetil-lactosamina catalizada por la  $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans*.

Los resultados obtenidos en este estudio se pueden observar en la Figura 137, y en la Tabla 108 se presenta un estudio comparativo de los resultados obtenidos en los procesos de resolución cinética empleando disolventes sostenibles respecto a la resolución cinética en hexano.



**Figura 137.** Progreso de la resolución cinética de  $(R, S)$ -1-fenil-1-etanol catalizada por la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* en presencia de disolventes sostenibles: a) Enzima libre. b) Enzima inmovilizada sobre poli(GMA-co-HDDMA)-2.

En la Tabla 108 se presenta un estudio comparativo de los resultados obtenidos en los procesos de resolución cinética empleando disolventes sostenibles respecto a la resolución cinética llevada a cabo en hexano.

Como se puede observar en esta Tabla, se observan dos tendencias muy marcadas respecto a la influencia que ejercen los disolventes sostenibles en el proceso de resolución cinética de  $(R, S)$ -1-fenil-1-etanol:

1. El empleo de disolventes sostenibles derivados de biomasa originan una disminución en la velocidad de la reacción del proceso de resolución cinética respecto al empleo de *n*-hexano tanto en la enzima libre como en la inmovilizada. Este descenso de la velocidad de reacción, al emplear diferentes disolventes sostenibles, puede ser relacionado con un aumento de la actividad de agua ( $a_w$ ), que condiciona la tasa de hidrólisis secundaria del producto, como observaron *Kaftzik y col.* en 2002.<sup>370</sup> Este aumento de velocidad de reacción también puede ser atribuido a la interacción de los componentes de los disolventes sostenibles con grupos cargados situados en o cerca del centro activo de la enzima.<sup>370</sup> A su vez se puede observar que la velocidad de reacción disminuye al aumentar la polaridad del disolvente sostenible empleado (ver polaridades de disolventes sostenibles en el apartado 5.5.1.1.1, Tabla 105).



2. El empleo de líquidos iónicos aumenta la velocidad de la reacción del proceso de resolución cinética en la mayoría de los casos, tanto en la enzima libre como en la enzima inmovilizada, excepto cuando se emplea el [Emin] [BF<sub>4</sub>] con el que obtiene una velocidad similar a la que obtiene empleando hexano como disolvente. Sin embargo, el empleo de líquidos iónicos produce una pérdida de enantioselectividad en el proceso de resolución cinética. El aumento de la velocidad de reacción obtenido gracias al empleo de los diferentes líquidos iónicos puede ser relacionado con un descenso de la actividad de agua ( $a_w$ ), debido a la interacción del líquido iónico con el agua, que condiciona la tasa de hidrólisis secundaria del producto, como observaron *Kaftzik y col.* en 2002.<sup>370</sup> Este aumento de velocidad de reacción también puede ser atribuido a la interacción de los componentes de los líquidos iónicos con grupos cargados situados en o cerca del centro activo de la enzima.<sup>370</sup> Esta variación en la actividad, que origina un aumento de la velocidad de la reacción, supone un efecto negativo en la enantioselectividad del proceso de resolución cinética. Especialmente en el caso de las lipasas, uno de los factores que más influye en la enantioselectividad de la reacción es la actividad de agua,<sup>77</sup> y se han reportado varios ejemplos en los que un descenso de la actividad de agua origina un descenso en la enantioselectividad de la reacción catalizada por la lipasa.<sup>554-559</sup>

**Tabla 108.** Influencia de los disolventes sostenibles en el proceso de resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-1-etanol.

Biocatalizador (mg enzima)	Disolvente	Tiempo reacción (h)	Conversión (%)	Conversión isómero R (%)	Conversión isómero S (%)	$U_e^a$ ( $\mu\text{mol/h mg enz.}$ )	$Y_a^b$ (%)
Enzima libre (0.25 mg)	Hexano	4	49	49	0	196	100
	GC9	4	27	27	0	108	55
	GC12	4	31	31	0	124	63
	DMA3	4	38	38	0	152	76
	DMA4	4	41	41	0	164	84
	DMA5	4	42	42	0	168	86
	DMA6	4	46	46	0	184	94
	[Bmin][PF <sub>6</sub> ]	4	62	50	12	248	127
	[Emin][BF <sub>4</sub> ]	4	48	26	22	192	98
	[Bmin][PFA]	4	60	49	11	240	122
poli(GMA-co-HDDMA)-2 (0.12 mg)	Hexano	1,5	49	49	0	1089	556
	GC9	1,5	28	28	0	623	318
	GC12	1,5	30	32	0	711	363
	DMA3	1,5	36	36	0	800	408
	DMA4	1,5	40	40	0	889	454
	DMA5	1,5	43	43	0	956	488
	DMA6	1,5	45	45	0	1000	510
	[Bmin][PF <sub>6</sub> ]	1,5	58	44	14	1289	658
	[Emin][BF <sub>4</sub> ]	1,5	47	39	8	1044	533
	[Bmin][PFA]	1,5	53	40	14	1178	601

<sup>a</sup> Actividad específica efectiva ( $U_e$ ): ( $\eta_{\text{rac}} \times C$ ) / ( $t \times m_{\text{enz}}$ ), donde  $\eta_{\text{rac}}$ :  $\mu\text{moles}$  de reactivo racémico; C: conversión de la resolución cinética expresada en tanto por uno; t: tiempo de reacción (horas);  $m_{\text{enz}}$ : mg enzima empleados en la resolución cinética.

<sup>b</sup> Rendimiento de actividad ( $Y_a$ ):  $U_{e,n} / U_{e,\text{ref}}$ , donde  $U_{e,n}$ : actividad específica efectiva de cada caso;  $U_{e,\text{ref}}$ : actividad específica efectiva de la enzima libre en hexano.

- **Resumen comparativo de la resolución cinética enzimática de (*R*, *S*)-1-fenil-1-etanol empleando la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* con diferentes trabajos publicados por otros grupos de investigación.**

Se ha realizado un estudio comparativo de los resultados obtenidos en esta memoria con los resultados publicados por otros grupos de investigación sobre la resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-1-etanol empleando la lipasa de *Pseudomonas fluorescens*. Los resultados obtenidos en dicho estudio comparativo se puede observar en la Tabla 109. En este estudio comparativo, se tiene que tener en cuenta que aunque se emplee la misma enzima, la actividad enzimática, eficiencia catalítica, estabilidad, etc. pueden variar de unas a otras debido a que presenten diferente origen, pureza, hayan sido expresadas en otros organismos, modificación genética, etc. Además es importante observar que las condiciones de reacción varían de unos estudios a otros. Por todo esto, la mejor comparativa posible sería la que tiene en cuenta la mejora obtenida en el proceso de resolución cinética debido única y exclusivamente al proceso de inmovilización-estabilización de dichas enzimas.

**Tabla 109.** Estudio comparativo de la resolución cinética enzimática de (*R*, *S*)-1-fenil-1-etanol empleando la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* con diferentes trabajos publicados por otros grupos de investigación.

	Biocatalizador (mg enzima)	Disolvente	Tiempo reacción (horas)	Conversión (%)	Conversión isómero R (%)	U <sub>e</sub> <sup>a</sup> (μmol/h mg enz.)	Y <sub>a</sub> <sup>b</sup> (%)
1	Enzima libre (0.25 mg)	Hexano	4	49	49	196	100
		GC9	4	27	27	108	55
		GC12	4	31	31	124	63
		DMA3	4	38	38	152	76
		DMA4	4	41	41	164	84
		DMA5	4	42	42	168	86
		DMA6	4	46	46	184	94
		[Bmin][PF <sub>6</sub> ]	4	62	50	248	127
		[Emin][BF <sub>4</sub> ]	4	48	26	192	98
		[Bmin][PFA]	4	60	49	240	122
		Hexano	1,5	49	49	1089	556
		GC9	1,5	28	28	623	318
		GC12	1,5	30	32	711	363
		DMA3	1,5	36	36	800	408
		DMA4	1,5	40	40	889	454
DMA5	1,5	43	43	956	488		
DMA6	1,5	45	45	1000	510		
[Bmin][PF <sub>6</sub> ]	1,5	58	44	1289	658		
[Emin][BF <sub>4</sub> ]	1,5	47	39	1044	533		
[Bmin][PFA]	1,5	53	40	1178	601		
2 <sup>431</sup>	Enzima libre (0.04 mg)	terbutanoato de metilo	-	-	-	1500	100
	Sílica modificada (3.7 mg)	terbutanoato de metilo	-	-	-	1340	89
3 <sup>436</sup>	Enzima libre (50 mg)	Hexano:THF (2:1)	0.25	28	28	9	100
	Celita 545 modificada (50 mg)	Hexano:THF (2:1)	2	39	39	1.6	18

1. Condiciones de reacción: 1.5 mL de hexano, hexano 2mM en disolvente sostenible ó hexano 30% líquido iónico, 0.4 mmol de (*R*, *S*)-1-fenil-1-etanol y 1.2 mmol de butirato de vinilo. T<sup>a</sup>: 25°C, 200 r.p.m.

2.<sup>431</sup> Condiciones de reacción: 10 mL terbutanoato de metilo, 5 mmol de (*R*, *S*)-1-fenil-1-etanol y 15 mmol de acetato de vinilo. T<sup>a</sup>: 20°C, 200 r.p.m.

3.<sup>436</sup> Condiciones de reacción: 1 mL hexano:THF (2:1), 0.4 mmol de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol y 0.8 mmol de butirato de vinilo. T<sup>a</sup>: 30°C, 1000 r.p.m.

<sup>a</sup> Actividad específica efectiva ( $U_e$ ):  $(\eta_{rac} \times C) / (t \times m_{enz})$ , donde  $\eta_{rac}$ :  $\mu$ moles de reactivo racémico; C: conversión de la resolución cinética expresada en tanto por uno; t: tiempo de reacción (horas);  $m_{enz}$ : mg enzima empleados en la resolución cinética.

<sup>b</sup> Rendimiento de actividad ( $Y_a$ ):  $U_{e,n} / U_{e,ref}$ , donde  $U_{e,n}$ : actividad específica efectiva de cada caso;  $U_{e,ref}$ : actividad específica efectiva de la enzima libre.

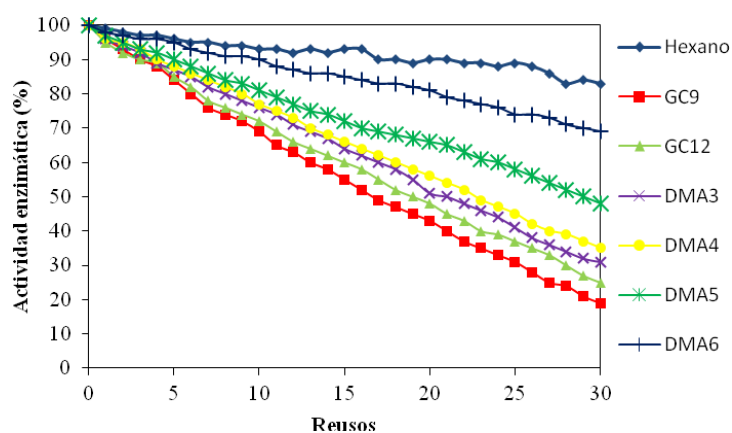
Como se puede observar en esta Tabla, los resultados obtenidos en esta memoria de tesis empleando *n*-hexano como disolvente, en la que el proceso resolutivo con la enzima inmovilizada es 5,5 veces más efectivo que con la enzima libre, mejoran los resultados obtenidos por otros grupos de investigación.<sup>431, 436</sup>

### 5.5.2.1.1.1.2. Reutilización de la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* inmovilizada sobre poli(GMA-*co*-HDDMA)-2 en la resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol.

Se realizó un estudio sobre la reutilización de la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* inmovilizada sobre poli(GMA-*co*-HDDMA)-2 en la resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol. Dicho estudio fue llevado a cabo siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.4.2.1.1.1.2. Los resultados obtenidos en dicho estudio a parecen reflejados en la Figura 138.

Como se puede observar en esta Figura, la estabilidad del derivado se ve afectada por el medio de reacción, disminuyendo según aumenta la polaridad del disolvente sostenible empleado. Este fenómeno se debe principalmente a que al aumentar la polaridad del medio de reacción disminuye la velocidad del proceso de resolución cinética (ver polaridades de disolventes sostenibles en el apartado 5.5.1.1.1, Tabla 105), y por lo tanto aumenta el tiempo empleado en cada reuso.

El mejor resultado de reusabilidad del derivado inmovilizado se ha obtenido empleando *n*-hexano como disolvente, reteniéndose el 83% de la actividad enzimática inicial tras 30 reusos.



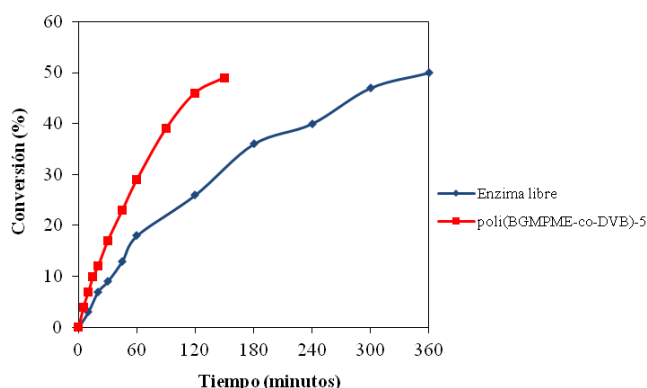
**Figura 138.** Reutilización de la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* inmovilizada sobre poli(GMA-*co*-HDDMA)-2 en la resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol.

Con los líquidos iónicos (LIs) no se realizó el estudio de reusabilidad debido a que los LIs quedó atrapado en el derivado inmovilizado y no pudo ser eliminado tras los lavados llevados a cabo con hexano.

Ninguno de los trabajos referenciados en esta memoria, sobre la resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol empleando la lipasa de *Pseudomonas fluorescens*, aporta datos de reusabilidad del derivado inmovilizado.

#### 5.5.2.1.1.2. Resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol con lipasa de *Pseudomonas cepacia*.

En la Figura 139 se pueden observar los resultados obtenidos en la resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol con la enzima libre, 34 mg de preparado enzimático (0.50 mg de enzima, 232 U $\text{mg}^{-1}$ ) y con la enzima inmovilizada, 10 mg de poli(BGMPME-co-DVB)-5 (0.18 mg de enzima, 200 U $\text{mg}^{-1}$ ), llevada a cabo siguiendo el procedimiento experimental descrito en el apartado 6.4.2.1.1.2.



**Figura 139.** Progreso de la resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol catalizada por la lipasa de *Pseudomonas cepacia*.

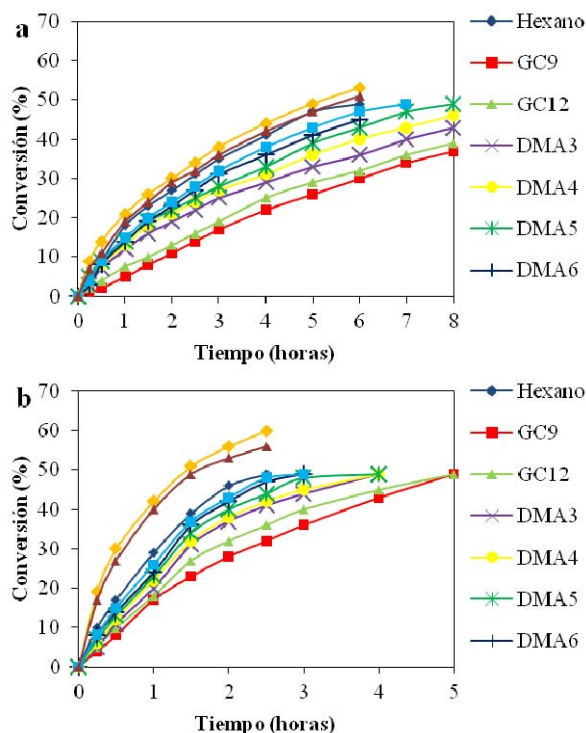
Como se puede observar en esta Figura, se produce el mismo fenómeno que con la lipasa de *Pseudomonas fluorescens*, es decir, la enzima inmovilizada es mucho más rápida que la enzima libre en la resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol. Este fenómeno, como se explico con anterioridad, podría ser debido a efectos estabilizantes<sup>33, 429</sup> ó efectos de hiperactivación.<sup>550-553</sup>

#### 5.5.2.1.1.2.1. Resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol con lipasa de *Pseudomonas cepacia* en presencia de disolventes sostenibles.

Se estudió la influencia de los disolventes sostenibles en el proceso de resolución cinética del (*R, S*)-1-fenil-1 etanol siguiendo el procedimiento experimental descrito en el apartado 6.4.2.1.1.2.1. Para ello se emplearon mezclas de *n*-hexano 2 mM de disolventes provenientes de biomasa (GC9, GC12, DMA4, DMA5 y DMA6), y mezclas de de *n*-hexano al 30% en líquido

iónico ([Bmin] [PF<sub>6</sub>], [Emin] [BF<sub>4</sub>] y [Bmin] [PAF]), condiciones de concentración de disolventes sostenibles que fueron anteriormente empleadas en el caso de la síntesis enzimática de *N*-acetil-lactosamina catalizada por la  $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans*.

Los resultados obtenidos en este estudio se pueden observar en la Figura 140, y en la Tabla 110 se presenta un estudio comparativo de los resultados obtenidos en los procesos de resolución cinética empleando disolventes sostenibles respecto a la resolución cinética en hexano.



**Figura 140.** Progreso de la resolución cinética de (R, S)-1-fenil-1-etanol catalizada por la lipasa de *Pseudomonas cepacia* en presencia de disolventes sostenibles: a) Enzima libre. b) Enzima inmovilizada sobre poli(BGMPME-co-DVB)-5.

Como se puede observar en esta Tabla, se observan dos tendencias muy marcadas respecto a la influencia que ejercen los disolventes sostenibles en el proceso de resolución cinética de (R, S)-1-fenil-1-etanol como sucedió anteriormente con la lipasa de *Ps. fluorescens*:

1. El empleo de disolventes sostenibles derivados de biomasa originan una disminución en la velocidad de la reacción del proceso de resolución cinética respecto al empleo de *n*-hexano tanto en la enzima libre como en la inmovilizada. Este descenso de la velocidad de reacción, al emplear diferentes disolventes sostenibles, puede ser relacionado con un aumento de la actividad de agua ( $a_w$ ), que condiciona la tasa de hidrólisis secundaria del producto, como observaron *Kaftzik y col.* en 2002.<sup>370</sup> Este aumento de velocidad de reacción también puede ser atribuido a la interacción de los componentes de los disolventes sostenibles con grupos cargados situados en o cerca del centro activo de la enzima.<sup>370</sup> A su vez se puede observar que la velocidad de reacción disminuye al aumentar la polaridad del disolvente sostenible empleado (ver polaridades de disolventes sostenibles en el apartado 5.5.1.1.1, Tabla 105).

2. El empleo de líquidos iónicos aumenta la velocidad de la reacción del proceso de resolución cinética en la mayoría de los casos, tanto en la enzima libre como en la enzima inmovilizada, excepto cuando se emplea el [Emin] [BF<sub>4</sub>] con el que obtiene una velocidad similar a la que obtiene empleando hexano como disolvente. Sin embargo, el empleo de líquidos iónicos produce una pérdida de enantioselectividad en el proceso de resolución cinética. El aumento de la velocidad de reacción obtenido gracias al empleo de los diferentes líquidos iónicos puede ser relacionado con un descenso de la actividad de agua ( $a_w$ ), debido a la interacción del líquido iónico con el agua, que condiciona la tasa de hidrólisis secundaria del producto, como observaron *Kaftzik y col.* en 2002.<sup>370</sup> Este aumento de velocidad de reacción también puede ser atribuido a la interacción de los componentes de los líquidos iónicos con grupos cargados situados en o cerca del centro activo de la enzima.<sup>370</sup> Esta variación en la actividad, que origina un aumento de la velocidad de la reacción, supone un efecto negativo en la enantioselectividad del proceso de resolución cinética. Especialmente en el caso de las lipasas, uno de los factores que más influye en la enantioselectividad de la reacción es la actividad de agua,<sup>77</sup> y se han reportado varios ejemplos en los que un descenso de la actividad de agua origina un descenso en la enantioselectividad de la reacción catalizada por la lipasa.<sup>5</sup>

**Tabla 110.** Influencia de los disolventes sostenibles sobre el proceso de resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-1-etanol.

Biocatalizador (mg enzima)	Disolvente	Tiempo reacción (h)	Conversión (%)	Conversión isómero R (%)	Conversión isómero S (%)	$U_e^a$ ( $\mu\text{mol/h mg enz.}$ )	$Y_a^b$ (%)
Enzima libre (0.50 mg)	Hexano	6	49	49	0	65	100
	GC9	6	30	30	0	40	62
	GC12	6	32	32	0	42	65
	DMA3	6	36	36	0	48	74
	DMA4	6	40	40	0	53	82
	DMA5	6	43	43	0	57	88
	DMA6	6	45	45	0	60	92
	[Bmin][PF <sub>6</sub> ]	6	53	37	16	70	108
	[Emin][BF <sub>4</sub> ]	6	47	32	15	62	95
	[Bmin][PFA]	6	51	44	7	68	105
poli(BGMPME-co-DVB)-5 (0.18 mg)	Hexano	2,5	49	49	0	436	671
	GC9	2,5	32	32	0	284	436
	GC12	2,5	36	36	0	320	492
	DMA3	2,5	41	41	0	364	560
	DMA4	2,5	42	42	0	373	574
	DMA5	2,5	44	44	0	391	602
	DMA6	2,5	47	47	0	418	642
	[Bmin][PF <sub>6</sub> ]	2,5	60	45	15	533	821
	[Emin][BF <sub>4</sub> ]	2,5	48	34	14	427	656
	[Bmin][PFA]	2,5	56	48	8	498	766

<sup>a</sup> Actividad específica efectiva ( $U_e$ ):  $(\eta_{\text{rac}} \times C) / (t \times m_{\text{enz}})$ , donde  $\eta_{\text{rac}}$ :  $\mu\text{moles}$  de reactivo racémico; C: conversión de la resolución cinética expresada en tanto por uno; t: tiempo de reacción (horas);  $m_{\text{enz}}$ : mg enzima empleados en la resolución cinética.

<sup>b</sup> Rendimiento de actividad ( $Y_a$ ):  $U_{e,n} / U_{e,\text{ref}}$ , donde  $U_{e,n}$ : actividad específica efectiva de cada caso;  $U_{e,\text{ref}}$ : actividad específica efectiva del caso de la enzima libre en hexano.

• **Resumen comparativo de la resolución cinética enzimática de (*R*, *S*)-1-fenil-1-etanol empleando la lipasa de *Pseudomonas cepacia* con diferentes trabajos publicados por otros grupos de investigación.**

Se ha realizado un estudio comparativo de los resultados obtenidos en esta memoria con los resultados publicados por otros grupos de investigación sobre la resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-1-etanol empleando la lipasa de *Pseudomonas cepacia*. Los resultados obtenidos en dicho estudio comparativo se puede observar en la Tabla 111. En este estudio comparativo, se tiene que tener en cuenta que aunque se emplee la misma enzima, la actividad enzimática, eficiencia catalítica, estabilidad, etc. pueden variar de unas a otras debido a que presenten diferente origen, pureza, hayan sido expresadas en otros organismos, modificación genética, etc. Además es importante observar que las condiciones de reacción varían de unos estudios a otros. Por todo esto, la mejor comparativa posible sería la que tiene en cuenta la mejora obtenida en el proceso de resolución cinética debido única y exclusivamente al proceso de inmovilización-estabilización de dichas enzimas.

**Tabla 111.** Estudio comparativo de la resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-1-etanol empleando la lipasa de *Pseudomonas cepacia* con diferentes trabajos previamente publicados.

Nº	Biocatalizador (mg enzima)	Disolvente	Tiempo reacción (horas)	Conversión (%)	Conversión isómero R (%)	U <sub>e</sub> <sup>a</sup> (μmol/h mg enz.)	Y <sub>a</sub> <sup>b</sup> (%)
1	Enzima libre (0.50 mg)	Hexano	6	49	49	65	100
		GC9	6	30	30	40	62
		GC12	6	32	32	42	65
		DMA3	6	36	36	48	74
		DMA4	6	40	40	53	82
		DMA5	6	43	43	57	88
		DMA6	6	45	45	60	92
		[Bmin][PF <sub>6</sub> ]	6	53	37	70	108
		[Emin][BF <sub>4</sub> ]	6	47	32	62	95
	[Bmin][PFA]	6	51	44	68	105	
	poli(BGMPME-co-DVB)-5 (0.18 mg)	Hexano	2,5	49	49	436	671
		GC9	2,5	32	32	284	436
		GC12	2,5	36	36	320	492
		DMA3	2,5	41	41	364	560
		DMA4	2,5	42	42	373	574
		DMA5	2,5	44	44	391	602
		DMA6	2,5	47	47	418	642
[Bmin][PF <sub>6</sub> ]		2,5	60	45	533	821	
[Emin][BF <sub>4</sub> ]		2,5	48	34	427	656	
[Bmin][PFA]	2,5	56	48	498	766		
2 <sup>438</sup>	Enzima libre (60 mg)	Hexano	72	55	50	0.58	100
	Fibras de jengibre (60 mg)	Hexano	72	9	9	0.10	17
3 <sup>445</sup>	Enzima libre (480 mg)	Tolueno	24	30	30	0.08	100
	Carbón activo modificado (390 mg)	Tolueno	6	50	50	0.64	800
4 <sup>446</sup>	Enzima libre (0.75mg)	Isooctano	12	3.9	3.9	13.9	100
	Nanopartículas de circonio (0.81mg)	Isooctano	12	53.2	50	175	1259
5 <sup>447</sup>	Enzima libre (0.21mg)	Tolueno	24	44	44	0.87	100
	Nanopartículas magnéticas (0.21mg)	Tolueno	24	50	50	0.99	114
6 <sup>448</sup>	Enzima libre (1 mg)	[Bmin][PF <sub>6</sub> ]	2	8	8	40	100
	Agregado enzimático (1 mg)	[Bmin][PF <sub>6</sub> ]	2	50	50	250	625

1. Condiciones de reacción: 1.5 mL de hexano ó hexano 30% líquido iónico, 0.4 mmol de (*R*, *S*)-1-fenil-1-etanol y 1.2 mmol de butirato de vinilo. T<sup>a</sup>: 25°C, 200 r.p.m.

- 2.<sup>438</sup> Condiciones de reacción: 25 mL de hexano, 5 mmol de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol y 5 mmol de acetato de vinilo. T<sup>a</sup>: 35°C, 200 r.p.m.
  - 3.<sup>445</sup> Condiciones de reacción: 30 mL de tolueno, 3 mmol de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol y 6 mmol de acetato de vinilo. T<sup>a</sup>: 25°C, 300 r.p.m.
  - 4.<sup>446</sup> Condiciones de reacción: 4 mL de isooctano, 3.2 mmol de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol y 4.32 mmol de acetato de vinilo. T<sup>a</sup>: 30°C, 180 r.p.m.
  - 5.<sup>447</sup> Condiciones de reacción: 1 mL de tolueno, 0.01 mmol de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol y 0.03 mmol de acetato de vinilo. T<sup>a</sup>: 32°C, 800 r.p.m.
  - 6.<sup>448</sup> Condiciones de reacción: 1 mL de [Bmin][PF<sub>6</sub>], 1 mmol de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol y 1 mmol de acetato de vinilo. T<sup>a</sup>: 25°C, 250 r.p.m.
- <sup>a</sup> Actividad específica efectiva ( $U_e$ ):  $(\eta_{rac} \times C) / (t \times m_{enz})$ , donde  $\eta_{rac}$ :  $\mu$ moles de reactivo racémico; C: conversión de la resolución cinética expresada en tanto por uno; t: tiempo de reacción (horas);  $m_{enz}$ : mg enzima empleados en la resolución cinética.
- <sup>b</sup> Rendimiento de actividad ( $Y_a$ ):  $U_{e,n} / U_{e,ref}$ , donde  $U_{e,n}$ : actividad específica efectiva de cada caso;  $U_{e,ref}$ : actividad específica efectiva de la enzima libre.

Como se puede observar en esta Tabla, los mejores resultados aparecen en la entrada n° 3<sup>445</sup> (50% de conversión), en la que el proceso resolutorio con la enzima inmovilizada es 8 veces más efectivo que con la enzima libre. El segundo mejor resultado ha sido obtenido en esta memoria de tesis empleando *n*-hexano como disolvente (49% de conversión), en la que el proceso resolutorio con la enzima inmovilizada es 7 veces más efectivo que con la enzima libre.

#### 5.5.2.1.1.2.2. Reutilización de la lipasa de *Pseudomonas cepacia* inmovilizada sobre poli(BGMPME-*co*-DVB)-5 en la resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol.

Se estudio la reutilización de la lipasa de *Pseudomonas cepacia* inmovilizada sobre poli(BGMPME-*co*-DVB)-5 en la resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol llevando a cabo el procedimiento descrito en el apartado 6.4.2.1.1.2.1. Los resultados obtenidos en dicho estudio a parecen reflejados en la Figura 141.

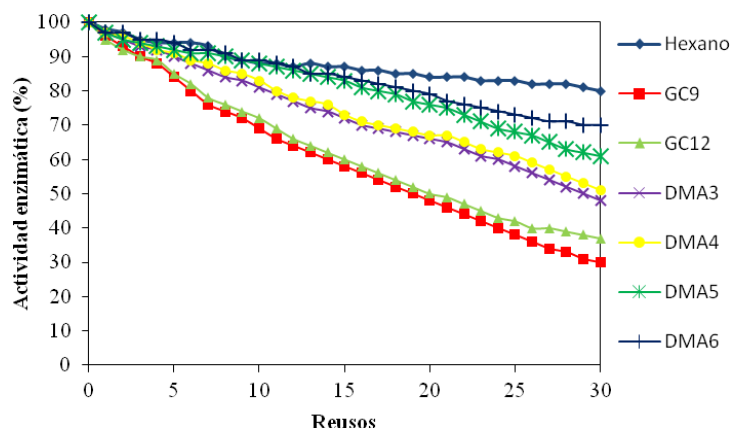
Como se puede observar en esta Figura, la estabilidad del derivado inmovilizado disminuye según aumenta la polaridad del disolvente sostenible empleado. Este fenómeno se debe principalmente a que al aumentar la polaridad del medio de reacción disminuye la velocidad del proceso de resolución cinética (ver polaridades de disolventes sostenibles en el apartado 5.5.1.1.1, Tabla 105), y por lo tanto aumenta el tiempo empleado en cada reuso.

El mejor resultado de reusabilidad del derivado inmovilizado se ha obtenido empleando *n*-hexano como disolvente, reteniéndose el 81% de la actividad enzimática inicial tras 30 reusos.

Como en el caso anterior, con los líquidos iónicos (LIs) no se realizó el estudio de reusabilidad debido a que los LIs quedaron atrapados en el derivado inmovilizado y no pudieron ser eliminados tras los lavados llevados a cabo con hexano.

De los trabajos referenciados en esta memoria, sobre la resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol empleando la lipasa de *Pseudomonas cepacia* inmovilizada sobre diferentes soportes, sólo 4 de ellos aportan datos de reusabilidad del derivado inmovilizado.<sup>438, 445-447</sup>





**Figura 141.** Reutilización de la lipasa de *Pseudomonas cepacia* inmovilizada sobre poli(BGMPME-co-DVB)-5 en la resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol.

A continuación se presenta un estudio comparativo de la reusabilidad de los diferentes derivados inmovilizados en la resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol (Tabla 112). Estudios de este tipo pueden originar errores de interpretación, ya que en los diferentes trabajos se emplean diferentes condiciones de reacción, por lo que la mejor comparativa posible sería aquella que tiene en cuenta la productividad del proceso y el porcentaje de retención de actividad enzimática del derivado inmovilizado.

**Tabla 112.** Reusabilidad de los derivado inmovilizados en la resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol.

Nº	Biocatalizador (mg enzima)	Reusos	Productividad total (mmol/ mg enzima)	Retención actividad final (%)
1	poli(BGMPME-co-DVB)-5 (0.18 mg)	30	29,2	81
2 <sup>438</sup>	Fibras de jengibre (60 mg)	6	0,10	58
3 <sup>445</sup>	Carbón activo modificado (42 mg)	9	0,03	91
4 <sup>446</sup>	Nanopartículas de circonio (0.81mg)	6	13,0	75
5 <sup>447</sup>	Nanopartículas magnéticas (0.21mg)	10	0,26	88

1. Condiciones de reacción: 1.5 mL de hexano, 0.4 mmol de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol y 1.2 mmol de butirato de vinilo. Tª: 25°C, 2,5 horas, 200 r.p.m.

2.<sup>438</sup> Condiciones de reacción: 25 mL de hexano, 5 mmol de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol y 5 mmol de acetato de vinilo. Tª: 28°C, 24 horas, 200 r.p.m.

3.<sup>445</sup> Condiciones de reacción: 3 mL de tolueno, 3 mmol de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol y 6 mmol de acetato de vinilo. Tª: reusos 0, 1 y 9 (25°C), reuso 2 (30°C), reuso 3 (35°C), reuso 4 (40°C), reuso 5 (45°C), reuso 6 (50°C), reuso 7 (55°C), reuso 8 (60°C); 6 horas, 300 r.p.m.

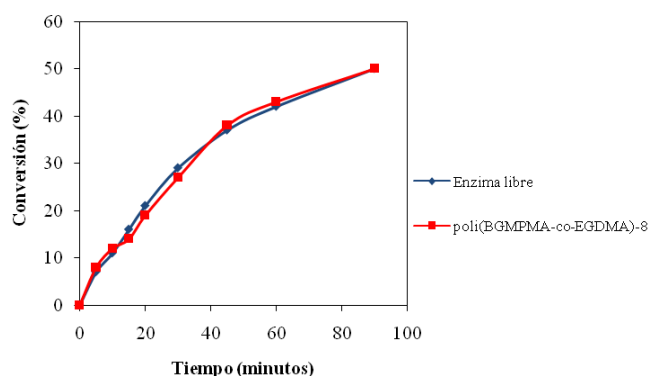
4.<sup>446</sup> Condiciones de reacción: 4 mL de isooctano, 3.2 mmol de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol y 4.32 mmol de acetato de vinilo. Tª: 30°C, 24 horas, 180 r.p.m.

5.<sup>447</sup> Condiciones de reacción: 1 mL de tolueno, 0.01 mmol de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol y 0.03 mmol de acetato de vinilo. Tª: 32°C, 24 horas, 800 r.p.m.

Como se puede ver en esta Tabla, los resultados obtenidos en esta memoria mejoran sustancialmente los resultados obtenidos por otros grupos de investigación.

### 5.5.2.1.1.3. Resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-1-etanol con lipasa de *Pseudomonas stutzeri*.

Como se comentó en el apartado 5.4.2.3, se optimizó la inmovilización de la lipasa de *Pseudomonas stutzeri* sobre dos polímeros diferentes, poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8 y poli(GMA-co-EGDMA)-2, para llevar a cabo las aplicaciones de los derivados inmovilizados. Para el estudio comparativo de la resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-1-etanol se seleccionó el derivado poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8 debido a que presentó una mayor actividad enzimática. Este estudio se llevó a cabo con 1 mg de preparado enzimático (0.16 mg de enzima, 105Umg<sup>-1</sup>) y 10 mg del derivado inmovilizado poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8 (0.17 mg de enzima, 87Umg<sup>-1</sup>), siguiendo el procedimiento experimental descrito en el apartado 6.4.2.1.1.3. Los resultados obtenidos en este estudio se pueden observar en la Figura 142.



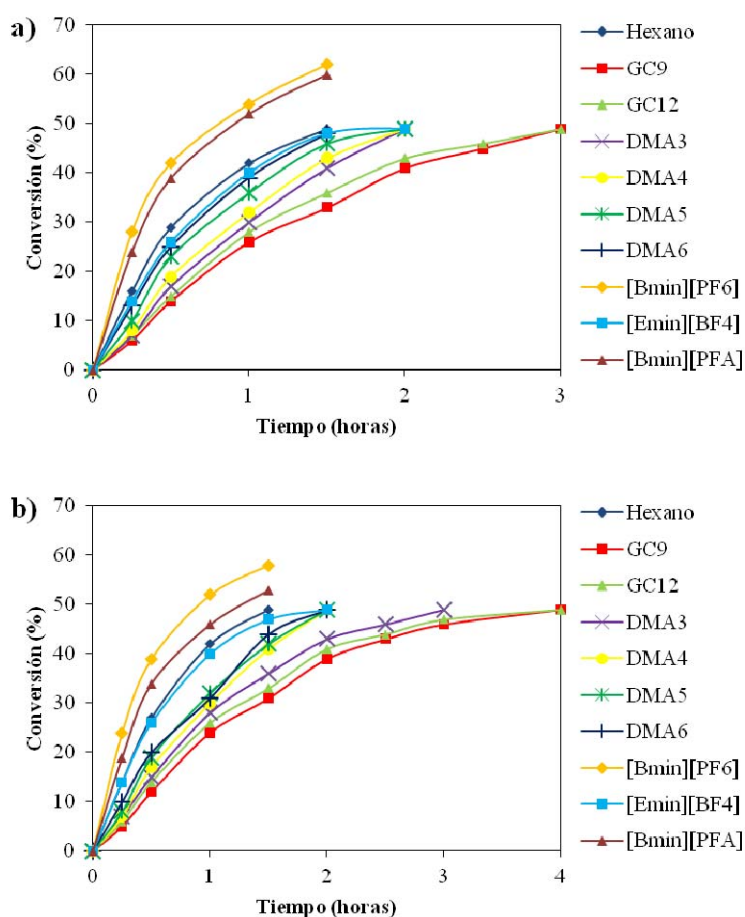
**Figura 142.** Progreso de la resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-1-etanol catalizada por la lipasa de *Pseudomonas stutzeri*.

Como se puede observar en esta Figura, tanto la enzima libre como la enzima inmovilizada presentan una cinética muy parecida. Por lo tanto, la enzima inmovilizada sufre una pequeña activación ya que se está empleando menos unidades catalíticas (14.8 U) que en el caso de la enzima libre (16.8 U). Este fenómeno podría ser debido a que el proceso de inmovilización enzimática evita la formación de agregados de intermoleculares de enzimas al mantener las moléculas de enzima retenidas en una determinada región del espacio y proporciona una mayor resistencia frente a la desactivación por efecto de disolventes orgánicos al tener estabilizada su estructura terciaria.<sup>33, 429</sup> En este caso no se observa un fenómeno de hiperactivación originado por la estabilización de la conformación abierta de la lipasa (conformación con la tapa abierta) durante el proceso de inmovilización.<sup>550-553</sup>

Estos datos concuerdan con la posible estructura tridimensional de la lipasa *Pseudomonas stutzeri* determinada por modelado de homología a partir de la secuencia tentativa.<sup>476</sup> Según este modelado, los aminoácidos que conforman el centro catalítico se encuentran bastante expuestos al medio, lo que hace suponer que probablemente en esta hipotética estructura no exista "lid" ó tapadera, tal y como sucede en la lipasa de *P. mendocina* usada como modelo.

### 5.5.2.1.1.3.1. Resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-1-etanol con lipasa de *Pseudomonas stutzeri* en presencia de disolventes sostenibles.

Se estudió la influencia de los disolventes sostenibles en el proceso de resolución cinética del (*R*, *S*)-1-fenil-1 etanol siguiendo el procedimiento experimental descrito en el apartado 6.4.2.1.1.2.1. Para ello se emplearon mezclas de *n*-hexano 2 mM de disolventes provenientes de biomasa (GC9, GC12, DMA4, DMA5 y DMA6), y mezclas de de *n*-hexano al 30% en líquido iónico ([Bmin] [PF<sub>6</sub>], [Emin] [BF<sub>4</sub>] y [Bmin] [PAF]). Los resultados obtenidos en este estudio se pueden observar en la Figura 143, y en la Tabla 113 se presenta un estudio comparativo de los resultados obtenidos en los procesos de resolución cinética empleando disolventes sostenibles respecto a la resolución cinética en hexano.



**Figura 143.** Progreso de la resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-1-etanol catalizada por la lipasa de *Pseudomonas stutzeri* en presencia de disolventes sostenibles: a) Enzima libre. b) Enzima inmovilizada sobre poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8.

**Tabla 113.** Influencia de los disolventes sostenibles sobre el proceso de resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol.

Biocatalizador (mg enzima)	Disolvente	Tiempo reacción (h)	Conversión (%)	Conversión isómero R (%)	Conversión isómero S (%)	$U_e^a$ ( $\mu\text{mol/h mg enz.}$ )	$Y_a^b$ (%)
Enzima libre (0.16 mg)	Hexano	1,5	49	49	0	817	100
	GC9	1,5	33	33	0	550	67
	GC12	1,5	36	36	0	600	73
	DMA3	1,5	41	41	0	683	84
	DMA4	1,5	43	43	0	717	88
	DMA5	1,5	46	46	0	767	94
	DMA6	1,5	48	48	0	800	98
	[Bmin][PF <sub>6</sub> ]	1,5	62	50	12	1033	126
	[Emin][BF <sub>4</sub> ]	1,5	48	26	22	800	98
	[Bmin][PFA]	1,5	60	49	11	1000	122
poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8 (0.17 mg)	Hexano	1,5	49	49	0	769	94
	GC9	1,5	31	31	0	517	63
	GC12	1,5	33	33	0	550	67
	DMA3	1,5	36	36	0	600	73
	DMA4	1,5	41	41	0	683	84
	DMA5	1,5	42	42	0	700	86
	DMA6	1,5	44	44	0	734	90
	[Bmin][PF <sub>6</sub> ]	1,5	58	44	14	910	111
	[Emin][BF <sub>4</sub> ]	1,5	47	39	8	737	90
	[Bmin][PFA]	1,5	53	40	14	831	102

<sup>a</sup> Actividad específica efectiva ( $U_e$ ):  $(\eta_{\text{rac}} \times C) / (t \times m_{\text{enz}})$ , donde  $\eta_{\text{rac}}$ :  $\mu\text{moles}$  de reactivo racémico; C: conversión de la resolución cinética expresada en tanto por uno; t: tiempo de reacción (horas);  $m_{\text{enz}}$ : mg enzima empleados en la resolución cinética.

<sup>b</sup> Rendimiento de actividad ( $Y_a$ ):  $U_{e,n} / U_{e,\text{ref}}$ , donde  $U_{e,n}$ : actividad específica efectiva de cada caso;  $U_{e,\text{ref}}$ : actividad específica efectiva del caso de la enzima libre en hexano.

Como se puede observar en esta Tabla, se observan dos tendencias muy marcadas respecto a la influencia que ejercen los disolventes sostenibles en el proceso de resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol como sucedió anteriormente con las lipasas de *Ps. fluorescens* y *Ps. cepacia*:

1. El empleo de disolventes sostenibles derivados de biomasa originan una disminución en la velocidad de la reacción del proceso de resolución cinética respecto al empleo de *n*-hexano tanto en la enzima libre como en la inmovilizada. Este descenso de la velocidad de reacción, al emplear diferentes disolventes sostenibles, puede ser relacionado con un aumento de la actividad de agua ( $a_w$ ), que condiciona la tasa de hidrólisis secundaria del producto, como observaron *Kaftzik y col.* en 2002.<sup>370</sup> Este aumento de velocidad de reacción también puede ser atribuido a la interacción de los componentes de los disolventes sostenibles con grupos cargados situados en o cerca del centro activo de la enzima.<sup>370</sup> A su vez se puede observar que la velocidad de reacción disminuye al aumentar la polaridad del disolvente sostenible empleado (ver polaridades de disolventes sostenibles en el apartado 5.5.1.1.1, Tabla 105).

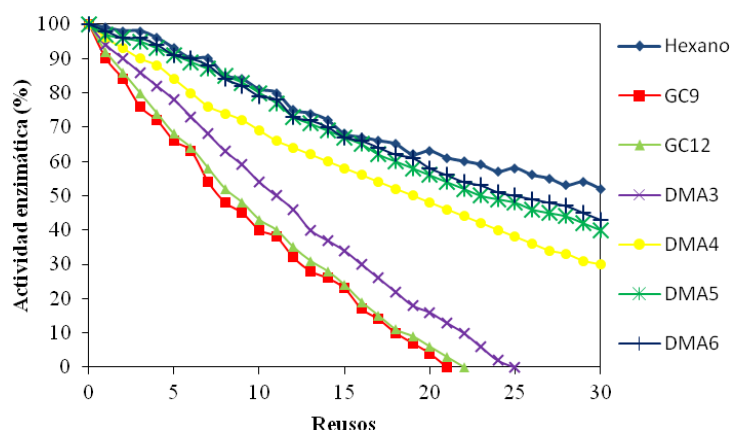
2. El empleo de líquidos iónicos aumenta la velocidad de la reacción del proceso de resolución cinética en la mayoría de los casos, tanto en la enzima libre como en la enzima inmovilizada, excepto cuando se emplea el [Emin] [BF<sub>4</sub>] con el que obtiene una velocidad similar a la que obtiene empleando hexano como disolvente. Sin embargo, el empleo de líquidos iónicos produce una pérdida de enantioselectividad en el proceso de resolución cinética. El aumento de

la velocidad de reacción obtenido gracias al empleo de los diferentes líquidos iónicos puede ser relacionado con un descenso de la actividad de agua ( $a_w$ ), debido a la interacción del líquido iónico con el agua, que condiciona la tasa de hidrólisis secundaria del producto, como observaron *Kaftzik y col.* en 2002.<sup>370</sup> Este aumento de velocidad de reacción también puede ser atribuido a la interacción de los componentes de los líquidos iónicos con grupos cargados situados en o cerca del centro activo de la enzima.<sup>370</sup> Esta variación en la actividad, que origina un aumento de la velocidad de la reacción, supone un efecto negativo en la enantioselectividad del proceso de resolución cinética. Especialmente en el caso de las lipasas, uno de los factores que más influye en la enantioselectividad de la reacción es la actividad de agua,<sup>77</sup> y se han reportado varios ejemplos en los que un descenso de la actividad de agua origina un descenso en la enantioselectividad de la reacción catalizada por la lipasa.<sup>554-559</sup>

#### 5.5.2.1.1.3.2. Reutilización de la lipasa de *Pseudomonas stutzeri* inmovilizada sobre poli (BGMPMA-co-EGDMA)-8 en la resolución cinética de (*R,S*)-1-fenil-1-etanol.

Se realizó un estudio, sobre la reutilización de la lipasa de *Pseudomonas stutzeri* inmovilizada sobre poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8 en la resolución cinética de (*R,S*)-1-fenil-1-etanol, llevado a cabo siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.4.2.1.1.3.2. Los resultados obtenidos en este estudio aparecen representados en la Figura 144.

Como se puede observar en esta Figura, la estabilidad del derivado inmovilizado disminuye según aumenta la polaridad del disolvente sostenible empleado. Este fenómeno se debe principalmente a que al aumentar la polaridad del medio de reacción disminuye la velocidad del proceso de resolución cinética (ver polaridades de disolventes sostenibles en el apartado 5.5.1.1.1, Tabla 105), y por lo tanto aumenta el tiempo empleado en cada reuso.



**Figura 144.** Reutilización de la lipasa de *Pseudomonas stutzeri* inmovilizada sobre poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8 en la resolución cinética de (*R,S*)-1-fenil-1-etanol.

#### 5.5.2.1.1.4. Resumen comparativo de la resolución cinética enzimática de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol con las diferentes lipasas.

A continuación se presenta un resumen de los resultados obtenidos en la resolución cinética enzimática de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol con las diferentes enzimas empleadas (Tabla 114), incluyendo los resultados publicados por otros grupos de investigación. En este estudio comparativo, se tiene que tener en cuenta que la comparativa directa puede originar errores de interpretación, ya que en varios trabajos emplean diferentes enzimas, con diferente actividad catalítica, estabilidad y propiedades, debido a que provienen de distintas casas comerciales o laboratorios con producción propia. Por lo que la mejor interpretación posible sería aquella que tuviera en cuenta la mejora que produce la inmovilización enzimática en el proceso resolutivo.

Como se puede observar en la Tabla 114, la enzima que presenta mayor productividad en la resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-1-propanol es la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* libre e inmovilizada sobre sílica modificada que aparece en la entrada 2<sup>431</sup> (1.5 y 1.3 mmol p. /mg enzima hora respectivamente). En segundo lugar, la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* inmovilizada sobre poli(GMA-co-HDDMA)-2 (1.1 mmol p. /mg enzima hora).

**Tabla 114.** Resultados obtenidos en la resolución cinética enzimática de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol.

Lipasa empleada	N°	Biocatalizador	Conversión (%)	e.e. producto (%)	E <sup>a</sup>	Productividad (mmol p. /mg enzima horas)
<i>Ps. fluorescens</i>	1	Enzima libre	49	>99	200	0.2
	2 <sup>431</sup>	poli(GMA-co-HDDMA)-2	49	>99	200	1.1
		Enzima libre	-	-	-	1.5
	3 <sup>436</sup>	Enzima libre	-	-	-	1.3
		Sílica modificada	28	>99	200	9x10 <sup>-3</sup>
		Celita 545 modificada	39	>99	200	2x10 <sup>-3</sup>
<i>Ps. cepacia</i>	1	Enzima libre	49	>99	200	0.1
	4 <sup>438</sup>	poli(BGMPME-co-DVB)-5	49	>99	200	0.4
		Enzima libre	55	-	-	6x10 <sup>-4</sup>
	5 <sup>445</sup>	Almidón jengibre	9	>99	200	1x10 <sup>-4</sup>
		Enzima libre	30	>99	200	8x10 <sup>-5</sup>
	6 <sup>446</sup>	Carbón activo modificado	50	>99	200	6x10 <sup>-4</sup>
		Enzima libre	3.9	-	-	1.4x10 <sup>-3</sup>
	7 <sup>447</sup>	Nanopartículas de circonio	50	-	-	0.17
		Enzima libre	44	>99	200	9x10 <sup>-4</sup>
	8 <sup>448</sup>	Nanopartículas magnéticas	50	>99	200	1x10 <sup>-3</sup>
Enzima libre		8	>99	200	4x10 <sup>-2</sup>	
<i>Ps. stutzeri</i>	1	Agregado enzimático	50	>99	200	0.25
		Enzima libre	49	>99	200	0.8
	poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8	49	>99	200	0.8	
<i>Rhizopus arrhizus</i>	9 <sup>437</sup>	Enzima libre	36	>99	200	4x10 <sup>-4</sup>
		Nanotubos de carbono	50	>99	200	5x10 <sup>-4</sup>
<i>Candida antarctica</i> B	10 <sup>439</sup>	Carbón mesoporoso	43	-	-	1.8x10 <sup>-3</sup>
	11 <sup>443</sup>	Novozyme 435	50	>99	200	2.4x10 <sup>-2</sup>
	12 <sup>444</sup>	Resina macroporosa	47	>99	200	0.23
<i>Candida antarctica</i> A	10 <sup>439</sup>	Carbón mesoporoso	47	-	-	2x10 <sup>-3</sup>
<i>Esterasa E. coli BioH</i>	12 <sup>444</sup>	Resina macroporosa	5	>99	200	2.5x10 <sup>-2</sup>

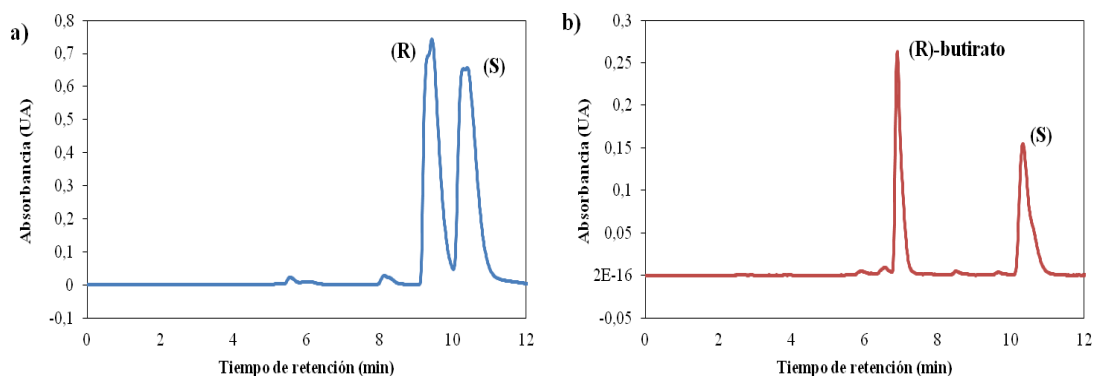
$$^a E = \{\ln[ee_p(1 - ee_s)]/(ee_p + ee_s)\} / \{\ln[ee_p(1 + ee_s)]/(ee_p + ee_s)\}.$$

1. Condiciones de reacción: 1.5 mL de hexano, 0.4 mmol de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol y 1.2 mmol de butirato de vinilo. T<sup>a</sup>: 25°C, 200 r.p.m.

- 2.<sup>431</sup> Condiciones de reacción: 10 mL terbutanoato de metilo, 5 mmol de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol y 15 mmol de acetato de vinilo. T<sup>a</sup>: 20°C, 200 r.p.m.
- 3.<sup>436</sup> Condiciones de reacción: 1 mL hexano:THF (2:1), 0.4 mmol de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol y 0.8 mmol de butirato de vinilo. T<sup>a</sup>: 30°C, 1000 r.p.m.
- 4.<sup>438</sup> Condiciones de reacción: 25 mL de hexano, 5 mmol de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol y 5 mmol de acetato de vinilo. T<sup>a</sup>: 35°C, 200 r.p.m.
- 5.<sup>445</sup> Condiciones de reacción: 30 mL de tolueno, 3 mmol de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol y 6 mmol de acetato de vinilo. T<sup>a</sup>: 25°C, 300 r.p.m.
- 6.<sup>446</sup> Condiciones de reacción: 4 mL de iso-octano, 3.2 mmol de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol y 4.32 mmol de acetato de vinilo. T<sup>a</sup>: 30°C, 180 r.p.m.
- 7.<sup>447</sup> Condiciones de reacción: 1 mL de tolueno, 0.01 mmol de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol y 0.03 mmol de acetato de vinilo. T<sup>a</sup>: 32°C, 800 r.p.m.
- 8.<sup>448</sup> Condiciones de reacción: 1 mL de [Bmin][PF<sub>6</sub>], 1 mmol de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol y 1 mmol de acetato de vinilo. T<sup>a</sup>: 25°C, 250 r.p.m.
- 9.<sup>437</sup> Condiciones de reacción: 10 mL heptano, 0.5 mmol de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol y 2 mmol de acetato de vinilo. T<sup>a</sup>: 55°C, 100 r.p.m.
- 10.<sup>439</sup> Condiciones de reacción: 3 mL terbutil metil éter, 0.3 mmol de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol y 0.9 mmol de acetato de vinilo. T<sup>a</sup>: 30°C, 220 r.p.m.
- 11.<sup>443</sup> Condiciones de reacción: 1 mL líquido iónico de síntesis, 0.28 mmol de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol y 0.44 mmol de acetato de vinilo. T<sup>a</sup>: 40°C.
- 12.<sup>444</sup> Condiciones de reacción: 5 mL hexano, 1 mmol de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol y 3 mmol de acetato de vinilo. T<sup>a</sup>: 25°C.

#### 5.5.2.1.1.5. Caracterización del producto obtenido en la resolución cinética enzimática de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol: (*R*)-butirato de 1-fenil-1-etilo (31).

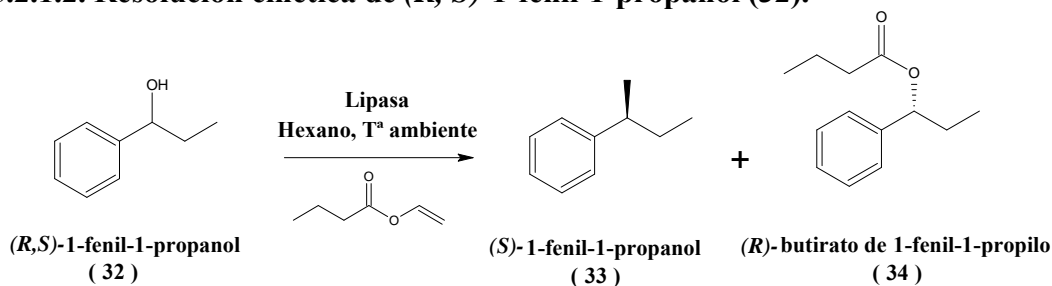
La evolución de las reacciones se llevó a cabo mediante el análisis de muestras tomadas a diferentes tiempos en HPLC. En la Figura 145 se pueden observar los cromatogramas obtenidos al inicio y al final del proceso de resolución cinética.



**Figura 145.** Cromatogramas de la resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol. a) Cromatograma del reactivo inicial. b) Cromatograma una vez concluido el proceso de resolución cinética.

La identificación del producto, (*R*)-butirato de 1-fenil-1-etilo (31), se realizó por comparación del tiempo de retención y del poder óptico rotatorio del producto con resultados obtenidos por otros grupos de investigación,<sup>458,459</sup> y su espectro de RMN una vez aislado y purificado. La asignación de las señales del espectro de RMN-<sup>1</sup>H y del espectro de RMN-<sup>13</sup>C, aparecen en la Parte Experimental.

### 5.5.2.1.2. Resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-1-propanol (32).



**Esquema 66.** Resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-1-propanol catalizada por lipasas.

El (*R,S*)-1-fenil-1-propanol, es otro sustrato muy empleado en resoluciones cinéticas enzimáticas.<sup>443, 460-662</sup> La resolución cinética se llevó a cabo siguiendo el procedimiento experimental descrito en el apartado 6.4.2.1.2 y el producto obtenido presentó una configuración absoluta *R*, de acuerdo a la regla de Kazlauskas.<sup>87</sup>

En este estudio de resolución cinética y en el resto de resoluciones cinéticas de compuestos derivados del (*R,S*)-1-fenil-1-etanol se ha dejado de llevar a cabo la reutilización de los derivados inmovilizados en dichos procesos ya que la reusabilidad de dichos derivados inmovilizados se verificó en la resolución cinética del (*R,S*)-1-fenil-1-etanol.

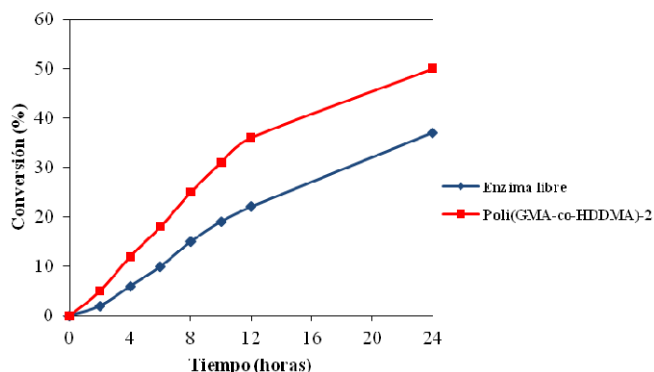
Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los estudios sobre la influencia de los disolventes sostenibles (líquidos iónicos) en el proceso de resolución cinética de (*R,S*)-1-fenil-1-etanol, se decidió dejar de emplear líquidos iónicos en el resto de procesos de resolución cinética debido a que originan una pérdida de estereoselectividad de las distintas enzimas en dichos procesos.

#### 5.5.2.1.2.1. Resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-1-propanol con lipasa de *Pseudomonas fluorescens*.

Se realizó un estudio comparativo de la resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-1-propanol entre la enzima libre, 33 mg de preparado enzimático (0.4 mg de enzima, 611U mg<sup>-1</sup>) y la enzima inmovilizada, 20 mg del derivado inmovilizado poli(GMA-co-HDDMA)-2 (0.24 mg de enzima, 519 Umg<sup>-1</sup>), llevando a cabo el procedimiento en el apartado 6.4.2.1.2.1. Los resultados obtenidos en dicho estudio se presentan en la Figura 146 y en la Tabla 115.

Como se observa en esta Figura, el proceso de resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-1-propanol con la enzima inmovilizada (50% de conversión en 24 horas) resultó mucho más rápido que con la enzima libre (37% de conversión en 24 horas). Este fenómeno, como se explico con anterioridad, podría ser debido a efectos estabilizantes<sup>33</sup> ó efectos de hiperactivación<sup>550-553</sup> originados por el proceso de inmovilización-estabilización enzimática.





**Figura 146.** Evolución de la resolución cinética de *(R, S)*-1-fenil-1-propanol con lipasa de *Pseudomonas fluorescens* libre e inmovilizada sobre poli(GMA-co-HDDMA)-2.

**Tabla 115.** Resultados obtenidos en la cinética de *(R, S)*-1-fenil-1-propanol con lipasa de *Pseudomonas fluorescens*.

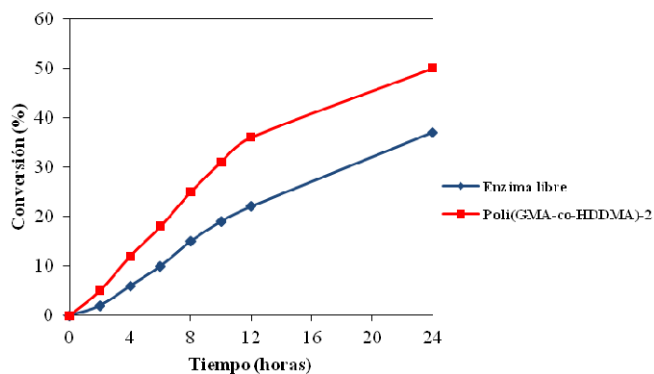
Biocatalizador (mg enzima)	Masa enzima (mg)	Tiempo reacción (h)	Conversión (%)	Conversión isómero R (%)	Conversión isómero S (%)	$U_e^a$ ( $\mu\text{mol/h mg enz.}$ )	$Y_a^b$ (%)
Enzima libre	0.4	24	37	37	0	15.4	100
poli(GMA-co-HDDMA)-2	0.24	24	50	50	0	34.7	225

<sup>a</sup> Actividad específica efectiva ( $U_e$ ):  $(\eta_{\text{rac}} \times C) / (t \times m_{\text{enz}})$ , donde  $\eta_{\text{rac}}$ :  $\mu\text{moles}$  de reactivo racémico; C: conversión de la resolución cinética expresada en tanto por uno; t: tiempo de reacción (horas);  $m_{\text{enz}}$ : mg enzima empleados en la resolución cinética.

<sup>b</sup> Rendimiento de actividad ( $Y_a$ ):  $U_{e,n} / U_{e,\text{ref}}$ , donde  $U_{e,n}$ : actividad específica efectiva de cada caso;  $U_{e,\text{ref}}$ : actividad específica efectiva del caso de la enzima libre en hexano.

#### 5.5.2.1.2.2. Resolución cinética de *(R, S)*-1-fenil-1-propanol con lipasa de *Pseudomonas cepacia*.

Es la resolución cinética de *(R, S)*-1-fenil-1-propanol se emplearon 80 mg de preparado enzimático (1.2 mg de enzima,  $232 \text{ U mg}^{-1}$ ) y 30 mg del derivado inmovilizado poli(BGMPME-co-DVB)-5 (0.54 mg de enzima,  $200 \text{ U mg}^{-1}$ ), desarrollando el procedimiento experimental descrito en el apartado 6.4.2.1.2.2. Los resultados obtenidos en dicho estudio se presentan en la Figura 147 y en la Tabla 116.



**Figura 147.** Evolución de la resolución cinética de *(R, S)*-1-fenil-1-propanol con lipasa de *Pseudomonas cepacia* libre e inmovilizada sobre poli(BGMPME-co-DVB)-5.

Como se observa en esta Figura, el proceso de resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-1-propanol con la enzima inmovilizada ( 50% de conversión en 10 horas) resultó mucho más rápido que con la enzima libre (35% de conversión en 24 horas). Fenómeno debido a efectos estabilizantes <sup>33</sup> ó efectos de hiperactivación <sup>550-553</sup> originados por el proceso de inmovilización-estabilización enzimática.

**Tabla 116.** Resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-1-propanol con lipasa de *Pseudomonas cepacia*.

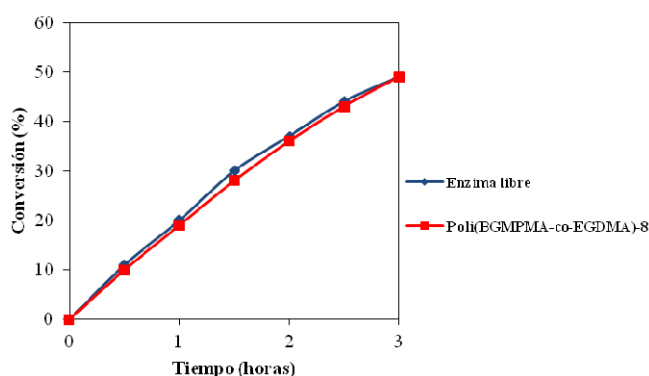
Biocatalizador (mg enzima)	Masa enzima (mg)	Tiempo reacción (h)	Conversión (%)	Conversión isómero R (%)	Conversión isómero S (%)	$U_e^a$ ( $\mu\text{mol/h mg enz.}$ )	$Y_a^b$ (%)
Enzima libre	1.20	24	35	35	0	4.9	100
poli(BGMPME-co-DVB)-5	0.54	10	50	50	0	37	756

<sup>a</sup> Actividad específica efectiva ( $U_e$ ):  $(\eta_{\text{rac}} \times C) / (t \times m_{\text{enz}})$ , donde  $\eta_{\text{rac}}$ :  $\mu\text{moles}$  de reactivo racémico; C: conversión de la resolución cinética expresada en tanto por uno; t: tiempo de reacción (horas);  $m_{\text{enz}}$ : mg enzima empleados en la resolución cinética.

<sup>b</sup> Rendimiento de actividad ( $Y_a$ ):  $U_{e,n} / U_{e,\text{ref}}$ , donde  $U_{e,n}$ : actividad específica efectiva de cada caso;  $U_{e,\text{ref}}$ : actividad específica efectiva del caso de la enzima libre en hexano.

#### 5.5.2.1.2.3. Resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-1-propanol con lipasa de *Pseudomonas stutzeri*.

Se llevo a cabo siguiendo el procedimiento experimental descrito en el apartado 6.4.2.1.2.3, para ello se empleando 5 mg de preparado enzimático (0.8 mg de enzima,  $105 \text{ U mg}^{-1}$ ) y 48 mg del derivado inmovilizado poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8 (0.8 mg de enzima,  $87 \text{ U mg}^{-1}$ ). Los resultados obtenidos en dicho estudio se presentan en la Figura 148 y en la Tabla 117.



**Figura 148.** Evolución de la resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-1-propanol con lipasa de *Pseudomonas stutzeri* libre e inmovilizada sobre poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8.

Como se observa en esta Figura, tanto la enzima libre como la enzima inmovilizada presentan un cinética muy parecida obteniéndose en ambos casos un 49% de conversión en 3 horas. En este proceso se observa una pequeña activación de la enzima inmovilizada (posiblemente por efectos estabilizantes <sup>33</sup> originados por la inmovilización enzimática) ya que se empleó menos unidades catalíticas ( $69.8 \text{ U}$ ) que en el caso de la enzima libre ( $84 \text{ U}$ ).

**Tabla 117.** Resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-1-propanol con lipasa de *Pseudomonas stutzeri*.

Biocatalizador (mg enzima)	Masa enzima (mg)	Tiempo reacción (h)	Conversión (%)	Conversión isómero R (%)	Conversión isómero S (%)	U <sub>e</sub> <sup>a</sup> (μmol/h mg enz.)	Y <sub>a</sub> <sup>b</sup> (%)
Enzima libre	0.8	3	49	49	0	81.7	100
poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8	0.8	3	49	49	0	81.7	100

<sup>a</sup> Actividad específica efectiva (U<sub>e</sub>): (η<sub>rac</sub> x C) / (t x m<sub>enz</sub>), donde η<sub>rac</sub>: μmoles de reactivo racémico; C: conversión de la resolución cinética expresada en tanto por uno; t: tiempo de reacción (horas); m<sub>enz</sub>: mg enzima empleados en la resolución cinética.

<sup>b</sup> Rendimiento de actividad (Y<sub>a</sub>): U<sub>e,n</sub> / U<sub>e,ref</sub>, donde U<sub>e,n</sub>: actividad específica efectiva de cada caso; U<sub>e,ref</sub>: actividad específica efectiva del caso de la enzima libre en hexano.

#### 5.5.2.1.2.4. Resumen comparativo de la resolución cinética enzimática de (*R*, *S*)-1-fenil-1-propanol con diferentes lipasas.

A continuación se presenta en la Tabla 118 un resumen de los resultados obtenidos en la resolución cinética enzimática, de (*R*, *S*)-1-fenil-1-propanol, con las diferentes enzimas empleadas. En esta Tabla también se han incluido los resultados publicados por otros grupos de investigación en el mismo proceso resolutivo.

**Tabla 118.** Resultados obtenidos en la resolución cinética enzimática de (*R,S*)-1-fenil-1-propanol.

Lipasa empleada	Nº	Biocatalizador	Conversión (%)	e.e. producto (%)	E <sup>a</sup>	Productividad (mmol p. / mg enzima horas)
<i>Ps. fluorescens</i>	1	Enzima libre	37	>99	>200	1.5x10 <sup>-2</sup>
		poli(GMA-co-HDDMA)-2	50	>99	>200	3.5x10 <sup>-2</sup>
<i>Ps. cepacia</i>	1	Enzima libre	35	>99	200	5x10 <sup>-3</sup>
		poli(BGMPME-co-DVB)-5	50	95	112	4x10 <sup>-2</sup>
<i>Ps. stutzeri</i>	1	Enzima libre	50	>99	>200	8.3x10 <sup>-2</sup>
		poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8	50	>99	>200	8.3x10 <sup>-2</sup>
<i>Candida antarctica</i> B	2 <sup>443</sup>	Novozyme 435	44	97	-	1.7x10 <sup>-2</sup>
	3 <sup>461</sup>	Novozyme 435	42	>99	-	1.8x10 <sup>-2</sup>

<sup>a</sup> E = {ln[ee<sub>p</sub>(1 - ee<sub>s</sub>)] / (ee<sub>p</sub> + ee<sub>s</sub>)} / {ln[ee<sub>p</sub>(1 + ee<sub>s</sub>)] / (ee<sub>p</sub> + ee<sub>s</sub>)}.

1. Condiciones de reacción: 1.5 mL de hexano, 0.4 mmol de (*R*, *S*)-1-fenil-1-propanol y 1.2 mmol de butirato de vinilo. T<sup>a</sup>: 25°C, 200 r.p.m.

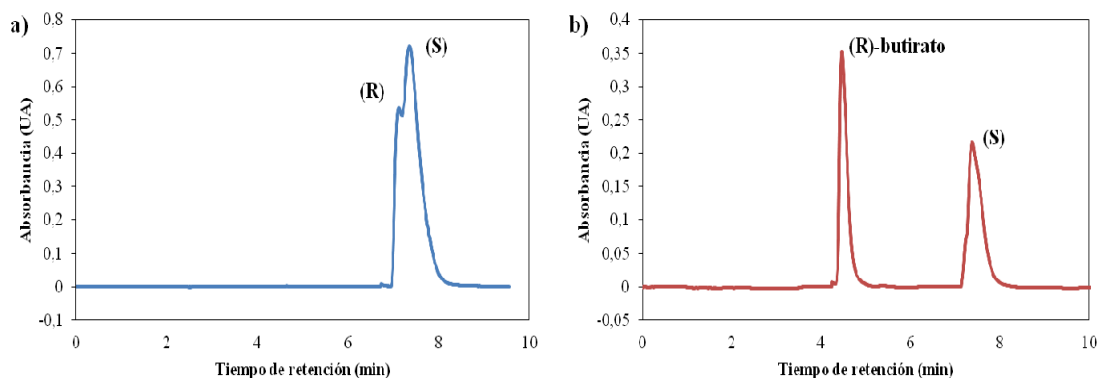
2<sup>443</sup> Condiciones de reacción: 1 mL líquido iónico de síntesis, 0.28 mmol de (*R*, *S*)-1-fenil-1-propanol y 0.44 mmol de acetato de vinilo. T<sup>a</sup>: 40°C.

3<sup>461</sup> Condiciones de reacción: 5 mL tolueno, 1 mmol de (*R*, *S*)-1-fenil-1-propanol y 0.44 mmol de acetato de *p*-clorofenilo. T<sup>a</sup>: 60°C.

Como se puede observar en esta Tabla, la enzima que presenta mayor productividad en la resolución cinética de (*R,S*)-1-fenil-1-propanol es la lipasa de *Pseudomonas stutzeri* (8.3x10<sup>-2</sup> mmol/ mg enzima hora).

### 5.5.2.1.2.5. Caracterización del producto obtenido en la resolución cinética enzimática de (*R*, *S*)-1-fenil-1-propanol: (*R*)-butirato de 1-fenil-1-propilo (34).

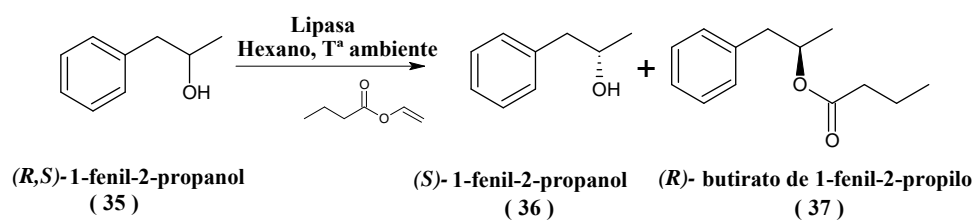
La evolución de las reacciones se llevó a cabo mediante el análisis de muestras tomadas a diferentes tiempos en HPLC. En la Figura 149 se pueden observar los cromatogramas obtenidos al inicio y al final del proceso de resolución cinética.



**Figura 149.** Cromatogramas de la resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-1-propanol. a) Cromatograma del reactivo inicial, (*R*, *S*)-1-fenil-1-propanol. b) Cromatograma una vez concluido el proceso de resolución cinética.

La identificación del producto como (*R*)-butirato de 1-fenil-1-propilo (34) se realizó por comparación del tiempo de retención y del poder óptico rotatorio del producto con resultados obtenidos por otro grupo de investigación,<sup>459</sup> y su espectro de RMN una vez aislado y purificado. La asignación de las señales del espectro de RMN-<sup>1</sup>H y del espectro de RMN-<sup>13</sup>C, aparecen en la Parte Experimental.

### 5.5.2.1.3. Resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-2-propanol (35).

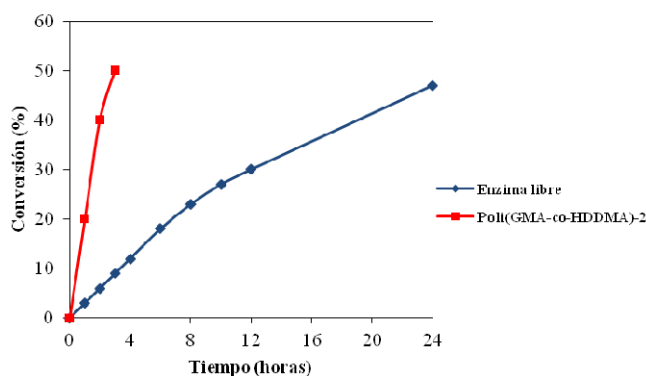


**Esquema 67.** Resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-2-propanol catalizada por lipasas.

El (*R*, *S*)-1-fenil-2-propanol, es otro sustrato muy empleado en resoluciones cinéticas enzimáticas.<sup>545, 560-562</sup> La resolución cinética se llevó a cabo siguiendo el procedimiento experimental descrito en el apartado 6.4.2.1.3 y el producto obtenido presentó una configuración absoluta *R*, de acuerdo a la regla de Kazlauskas.<sup>87</sup>

### 5.5.2.1.3.1. Resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-2-propanol con lipasa de *Pseudomonas fluorescens*.

La resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-2-propanol se llevo a cabo con 17 mg de preparado enzimático (0.2 mg de enzima, 611 U<sub>mg</sub><sup>-1</sup>) y 10 mg del derivado inmovilizado poli (GMA-*co*-HDDMA)-2 (0.12 mg de enzima, 519 U<sub>mg</sub><sup>-1</sup>), desarrollando el procedimiento experimental descrito en el apartado 6.4.2.1.3.1. Los resultados obtenidos en dicho estudio se presentan en la Figura 150 y en la Tabla 119.



**Figura 150.** Evolución de la resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-2-propanol con lipasa de *Pseudomonas fluorescens* libre e inmovilizada sobre poli(GMA-*co*-HDDMA)-2.

Como se observa en esta Figura, el proceso de resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-2-propanol con la enzima inmovilizada (50% de conversión en 3 horas) resultó mucho más rápido que con la enzima libre (47% de conversión en 24 horas). Este fenómeno, como se explicó con anterioridad, podría ser debido a efectos estabilizantes<sup>33</sup> y efectos de hiperactivación<sup>550-553</sup> originados por el proceso de inmovilización-estabilización enzimática.

**Tabla 119.** Resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-2-propanol con lipasa de *Ps. fluorescens*.

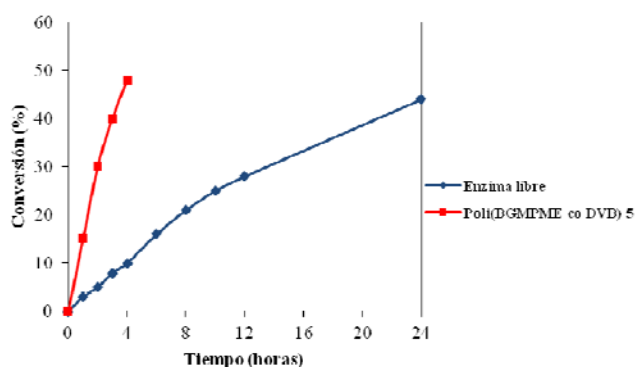
Biocatalizador (mg enzima)	Masa enzima (mg)	Tiempo reacción (h)	Conversión (%)	Conversión isómero R (%)	Conversión isómero S (%)	U <sub>e</sub> <sup>a</sup> (μmol/h mg enz.)	Y <sub>a</sub> <sup>b</sup> (%)
Enzima libre	0.2	24	47	47	0	39	100
poli(GMA- <i>co</i> -HDDMA)-2	0.12	3	50	50	0	555	1423

<sup>a</sup> Actividad específica efectiva (U<sub>e</sub>): (η<sub>rac</sub> × C) / (t × m<sub>enz</sub>), donde η<sub>rac</sub>: μmoles de reactivo racémico; C: conversión de la resolución cinética expresada en tanto por uno; t: tiempo de reacción (horas); m<sub>enz</sub>: mg enzima empleados en la resolución cinética.

<sup>b</sup> Rendimiento de actividad (Y<sub>a</sub>): U<sub>e,n</sub> / U<sub>e,ref</sub>, donde U<sub>e,n</sub>: actividad específica efectiva de cada caso; U<sub>e,ref</sub>: actividad específica efectiva del caso de la enzima libre en hexano.

### 5.5.2.1.3.2. Resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-2-propanol con lipasa de *Pseudomonas cepacia*.

La resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-2-propanol se llevó a cabo siguiendo el procedimiento experimental descrito en el apartado 6.4.2.3.2, empleando 80 mg de preparado enzimático (1.2 mg de enzima, 232Umg<sup>-1</sup>) y 30 mg del derivado inmovilizado poli (BGMPME-*co*-DVB)-5 (0.54 mg de enzima, 200Umg<sup>-1</sup>). Los resultados obtenidos en dicho estudio se presentan en la Figura 151 y en la Tabla 120.



**Figura 151.** Evolución de la resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-2-propanol con lipasa de *Pseudomonas cepacia* libre e inmovilizada sobre poli(BGMPME-*co*-DVB)-5.

Como se observa en esta Figura, el proceso de resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-2-propanol con la enzima inmovilizada (48% de conversión en 4 horas) resultó mucho más rápido que con la enzima libre (44% de conversión en 24 horas). Fenómeno debido, como se comentó previamente, a efectos estabilizantes<sup>33</sup> y efectos de hiperactivación<sup>550-553</sup> originados por el proceso de inmovilización-estabilización enzimática.

**Tabla 120.** Resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-2-propanol con lipasa de *Pseudomonas cepacia*.

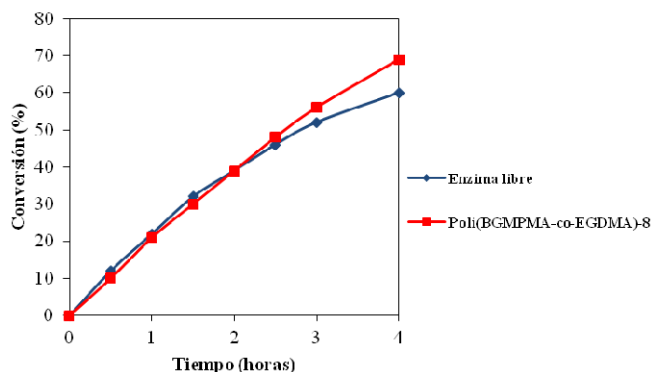
Biocatalizador (mg enzima)	Masa enzima (mg)	Tiempo reacción (h)	Conversión (%)	Conversión isómero R (%)	Conversión isómero S (%)	U <sub>e</sub> <sup>a</sup> (μmol/h mg enz.)	Y <sub>a</sub> <sup>b</sup> (%)
Enzima libre	1.2	24	44	44	0	6	100
poli(BGMPME- <i>co</i> -DVB)-5	0.54	4	48	48	0	89	1483

<sup>a</sup> Actividad específica efectiva (U<sub>e</sub>): (η<sub>rac</sub> x C) / (t x m<sub>enz</sub>), donde η<sub>rac</sub>: μmoles de reactivo racémico; C: conversión de la resolución cinética expresada en tanto por uno; t: tiempo de reacción (horas); m<sub>enz</sub>: mg enzima empleados en la resolución cinética.

<sup>b</sup> Rendimiento de actividad (Y<sub>a</sub>): U<sub>e,n</sub> / U<sub>e,ref</sub>, donde U<sub>e,n</sub>: actividad específica efectiva de cada caso; U<sub>e,ref</sub>: actividad específica efectiva del caso de la enzima libre en hexano.

### 5.5.2.1.3.3. Resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-2-propanol con lipasa de *Pseudomonas stutzeri*.

La resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-2-propanol se llevó a cabo con 5 mg de preparado enzimático (0.8 mg de enzima, 105Umg<sup>-1</sup>) y 48 mg del derivado inmovilizado poli (BGMPMA-co-EGDMA)-8 (0.8 mg de enzima, 87Umg<sup>-1</sup>) empleando el procedimiento experimental descrito en el apartado 6.4.2.1.3.3. Los resultados obtenidos en dicho estudio se presentan en la Figura 152 y en la Tabla 121.



**Figura 152.** Evolución de la resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-2-propanol con lipasa de *Pseudomonas stutzeri* libre e inmovilizada sobre poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8.

Como se observa en esta Figura, con la enzima inmovilizada se obtuvo un 69% de conversión en 4 horas y mientras que con la enzima libre se obtuvo un 60 % de conversión en el mismo tiempo. En este proceso se observa una pequeña activación de la enzima inmovilizada, posiblemente por efectos estabilizantes<sup>33</sup> originados por la inmovilización enzimática.

**Tabla 121.** Resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-2-propanol con lipasa de *Pseudomonas stutzeri*.

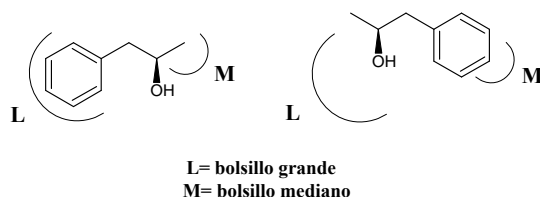
Biocatalizador (mg enzima)	Masa enzima (mg)	Tiempo reacción (h)	Conversión (%)	Conversión isómero R (%)	Conversión isómero S (%)	$U_e^a$ ( $\mu\text{mol/h mg enz.}$ )	$Y_a^b$ (%)
Enzima libre	0.8	4	60	40	20	75	100
poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8	0.8	4	69	49	20	86	115

<sup>a</sup> Actividad específica efectiva ( $U_e$ ): ( $\eta_{\text{rac}} \times C$ ) / ( $t \times m_{\text{enz}}$ ), donde  $\eta_{\text{rac}}$ :  $\mu\text{moles}$  de reactivo racémico; C: conversión de la resolución cinética expresada en tanto por uno; t: tiempo de reacción (horas);  $m_{\text{enz}}$ : mg enzima empleados en la resolución cinética.

<sup>b</sup> Rendimiento de actividad ( $Y_a$ ):  $U_{e,n} / U_{e,\text{ref}}$ , donde  $U_{e,n}$ : actividad específica efectiva de cada caso;  $U_{e,\text{ref}}$ : actividad específica efectiva del caso de la enzima libre en hexano.

Como se observa en esta Tabla, la enzima pierde enantioselectividad en la resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-2-propanol obteniéndose mezclas de (*R*) y (*S*) butiratos. Este fenómeno puede deberse a que al variar la posición del grupo hidroxilo, la lipasa de *Pseudomonas stutzeri* reconoce los dos enantiómeros debido a que puede albergar en su bolsillo catalítico mediano las dos partes del reactivo de partida (Esquema 59). Que se produzca este fenómeno al emplear este sustrato solamente con esta enzima podría deberse a que la diferencia

de tamaños de los bolsillos del centro activo de esta enzima no sea tan marcado como en las otras enzimas empleadas en esta resolución cinética.



**Figura 153.** Reconocimiento de los dos sustratos en el centro activo de la lipasa de *Pseudomonas stutzeri*.

#### 5.5.2.1.3.4. Resumen comparativo de la resolución cinética enzimática de (*R, S*)-1-fenil-2-propanol con diferentes lipasas.

En la Tabla 122 se presenta un resumen de los resultados obtenidos en la resolución cinética enzimática, de (*R, S*)-1-fenil-2-propanol, con las diferentes enzimas empleadas. En esta Tabla también se han incluido los resultados publicados por otros grupos de investigación en el mismo proceso resolutivo.

**Tabla 122.** Resultados obtenidos en la resolución cinética enzimática de (*R, S*)-1-fenil-2-propanol.

Lipasa empleada	N°	Biocatalizador	Conversión (%)	e.e. producto (%)	E <sup>a</sup>	Productividad (mmol p./mg enzima horas)
<i>Ps. fluorescens</i>	1	Enzima libre	47	>99	>200	$3.9 \times 10^{-2}$
		poli(GMA-co-HDDMA)-2	50	>99	>200	0.55
	2 <sup>545</sup>	Lipasa AK libre	43	97	>100	$5 \times 10^{-4}$
		Lipasa Ps.f. libre	41	>99	>100	$5 \times 10^{-4}$
	3 <sup>560</sup>	Enzima libre	52	90	>100	$2 \times 10^{-4}$
<i>Ps. cepacia</i>	1	Enzima libre	44	>99	>200	$6 \times 10^{-3}$
		poli(BGMPME-co-DVB)-5	48	>99	>200	$8.9 \times 10^{-2}$
	2 <sup>545</sup>	Enzima libre	46	82	23	$2 \times 10^{-4}$
		Partículas cerámicas	49	93	>100	$8 \times 10^{-4}$
	3 <sup>560</sup>	Enzima libre	52	90	>100	$2 \times 10^{-4}$
Amano lipasa libre		44	98	>100	$1.4 \times 10^{-4}$	
<i>Ps. stutzeri</i>	1	Enzima libre	60	68	23	$7.5 \times 10^{-2}$
<i>Candida antarctica B</i>	2 <sup>545</sup>	poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8	69	62	22	$8.6 \times 10^{-2}$
		Novozyme 435	40	>99	>100	$1.7 \times 10^{-2}$
	3 <sup>560</sup>	Enzima libre	71	39	10	$2 \times 10^{-4}$
<i>Candida rugosa</i>	2 <sup>545</sup>	Enzima libre	23	64	5	$1 \times 10^{-4}$
	3 <sup>560</sup>	Enzima libre	16	12	1.3	$5 \times 10^{-5}$
Lipozyme <sup>TM</sup> <i>Mucor miehei</i>	3 <sup>560</sup>	Enzima libre	49	98	>200	$1.5 \times 10^{-4}$
Lipozyme TL	3 <sup>560</sup>	Enzima libre	49	96	>100	$1.5 \times 10^{-4}$
Lipasa páncreas porcino	3 <sup>560</sup>	Enzima libre	14	88	20	$4 \times 10^{-5}$
<i>Carica papaya</i>	4 <sup>562</sup>	Enzima libre	50	>99	>200	$8 \times 10^{-4}$

$$^a E = \frac{\{\ln[ee_p(1 - ee_s)]/(ee_p + ee_s)\}}{\{\ln[ee_p(1 + ee_s)]/(ee_p + ee_s)\}}.$$

1. Condiciones de reacción: 1.5 mL de hexano, 0.4 mmol de (*R, S*)-1-fenil-2-propanol y 1.2 mmol de butirato de vinilo. T<sup>a</sup>: 25°C, 200 r.p.m.

2<sup>545</sup>. Condiciones de reacción: 1 mL de hexano, 1.5 mmol de (*R, S*)-1-fenil-2-propanol y 1 mL de acetato de vinilo. T<sup>a</sup>: 25°C.

3<sup>560</sup>. Condiciones de reacción: 2 mL de hexano: THF: acetato de vinilo (2:1:1) y 0.15 mmol de (*R, S*)-1-fenil-2-propanol. T<sup>a</sup>: 25°C, 1000 r.p.m.

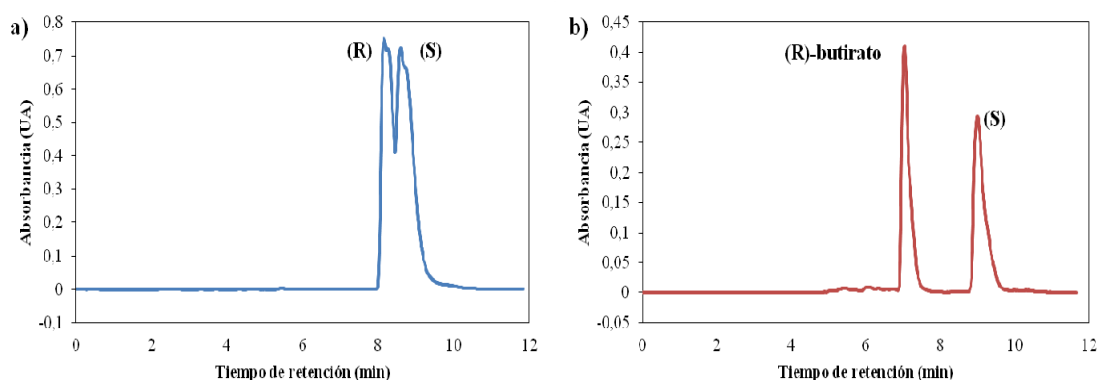
4<sup>562</sup>. Condiciones de reacción: 0.8 mL de ciclohexano, 0.1 mmol de (*R, S*)-1-fenil-2-propanol y 0.4 mmol de hexanoato de vinilo. T<sup>a</sup>: 45°C.



Como se puede observar en la Tabla 122, la enzima que presenta mayor productividad en la resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-2-propanol es la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* inmovilizada sobre el soporte poli(GMA-co-HDDMA)-2 (0.55 mmol/mg enzima hora).

#### 5.5.2.1.3.5. Caracterización del producto obtenido en la resolución cinética enzimática de (*R, S*)-1-fenil-2-propanol: (*R*)-butirato de 1-fenil-2-propilo (37).

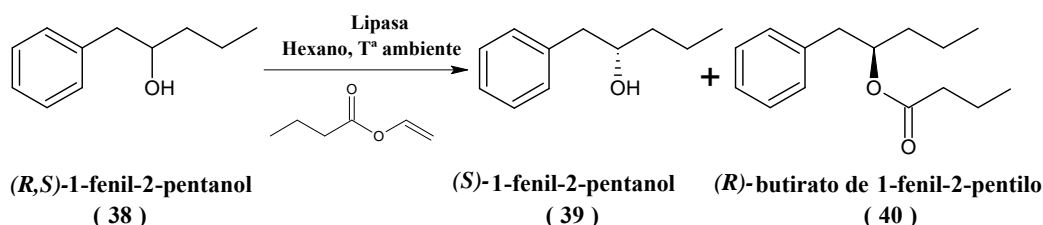
La evolución de las reacciones se llevó a cabo mediante el análisis de muestras tomadas a diferentes tiempos en HPLC. En la Figura 154 se pueden observar los cromatogramas obtenidos al inicio y al final del proceso de resolución cinética.



**Figura 154.** Cromatogramas de la resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-2-propanol. a) Cromatograma del reactivo inicial, (*R, S*)-1-fenil-2-propanol. b) Cromatograma una vez concluido el proceso de resolución cinética.

La identificación del producto como (*R*)-butirato de 1-fenil-2-propilo (37) se realizó por comparación del tiempo de retención y del poder óptico rotatorio del producto con resultados obtenidos por otros grupos de investigación,<sup>460-462</sup> y su espectro de RMN una vez aislado y purificado. La asignación de las señales del espectro de RMN-<sup>1</sup>H y del espectro de RMN-<sup>13</sup>C, aparecen en la Parte Experimental.

#### 5.5.2.1.4. Resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-2-pentanol (38).

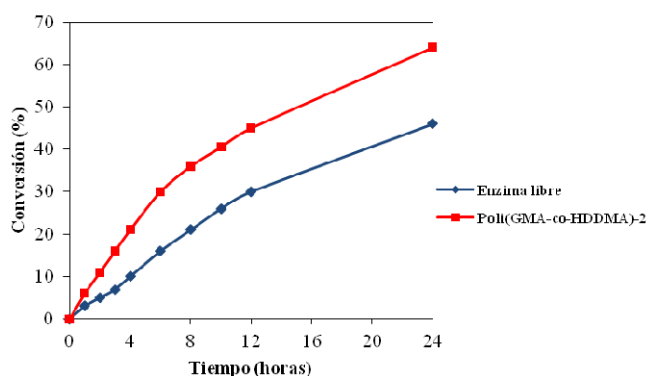


**Esquema 68.** Resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-2-pentanol catalizada por lipasas.

El (*R, S*)-1-fenil-2-pentanol, es otro sustrato que ha sido empleado en resoluciones cinéticas enzimáticas.<sup>562</sup> La resolución cinética se llevó a cabo siguiendo el procedimiento experimental descrito en el apartado 6.4.2.1.4 y el producto obtenido presentó una configuración absoluta *R*, de acuerdo a la regla de Kazlauskas.<sup>87</sup>

### 5.5.2.1.4.1. Resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-2-pentanol con lipasa de *Pseudomonas fluorescens*.

Se realizó un estudio comparativo de la resolución cinética de (*R,S*)-1-fenil-2-pentanol entre la enzima libre, 17 mg de preparado enzimático (0.2 mg de enzima, 611 U<sub>mg</sub><sup>-1</sup>) y la enzima inmovilizada, 10 mg del derivado inmovilizado poli(GMA-co-HDDMA)-2 (0.12 mg de enzima, 519 U<sub>mg</sub><sup>-1</sup>), llevando a cabo el procedimiento experimental descrito en el apartado 6.4.2.1.4.1. Los resultados obtenidos en dicho estudio se presentan en la Figura 155 y en la Tabla 123.



**Figura 154.** Evolución de la resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-2-propanol con lipasa de *Pseudomonas fluorescens* libre e inmovilizada sobre poli(GMA-co-HDDMA)-2.

Como se observa en esta Figura, el proceso de resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-2-pentanol con la enzima inmovilizada (64% de conversión en 24 horas) resultó mucho más rápido que con la enzima libre (46% de conversión en 24 horas). Este fenómeno, como se explicó con anterioridad, podría ser debido a efectos estabilizantes<sup>33</sup> y efectos de hiperactivación<sup>550-553</sup> originados por el proceso de inmovilización-estabilización enzimática.

**Tabla 123.** Resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-2-pentanol con la lipasa de *Pseudomonas fluorescens*.

Biocatalizador (mg enzima)	Masa enzima (mg)	Tiempo reacción (h)	Conversión (%)	Conversión isómero R (%)	Conversión isómero S (%)	U <sub>e</sub> <sup>a</sup> (μmol/h mg enz.)	Y <sub>a</sub> <sup>b</sup> (%)
Enzima libre	0.2	24	46	26	20	38	100
poli(GMA-co-HDDMA)-2	0.12	24	64	34	30	89	234

<sup>a</sup> Actividad específica efectiva (U<sub>e</sub>):  $(\eta_{rac} \times C) / (t \times m_{enz})$ , donde  $\eta_{rac}$ : μmoles de reactivo racémico; C: conversión de la resolución cinética expresada en tanto por uno; t: tiempo de reacción (horas); m<sub>enz</sub>: mg enzima empleados en la resolución cinética.

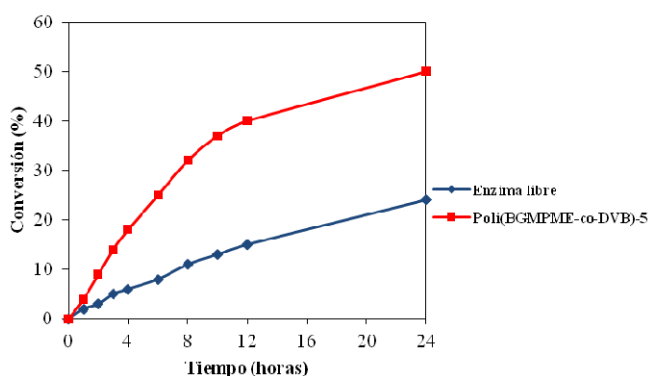
<sup>b</sup> Rendimiento de actividad (Y<sub>a</sub>): U<sub>e,n</sub> / U<sub>e,ref</sub>, donde U<sub>e,n</sub>: actividad específica efectiva de cada caso; U<sub>e,ref</sub>: actividad específica efectiva del caso de la enzima libre en hexano.

Como se observa en esta Tabla, la enzima pierde enantioselectividad en la resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-2-pentanol obteniéndose mezclas de (*R*) y (*S*) butiratos. Este fenómeno puede deberse a que al aumentar el tamaño del sustituyente pequeño, la lipasa de

*Pseudomonas fluorescens* reconoce los dos enantiómeros debido a que puede albergar en su bolsillo catalítico mediano las dos partes del reactivo de partida.

#### 5.5.2.1.4.2. Resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-2-pentanol con lipasa de *Pseudomonas cepacia*.

La resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-2-pentanol se llevó a cabo siguiendo el procedimiento experimental descrito en el apartado 6.4.2.1.4.2. Para ello se empleó 80 mg de preparado enzimático (1.2 mg de enzima, 232 U<sub>mg</sub><sup>-1</sup>) y 30 mg del derivado inmovilizado poli(BGMPME-co-DVB)-5 (0.54 mg de enzima, 200 U<sub>mg</sub><sup>-1</sup>). Los resultados obtenidos en dicho estudio se presentan en la Figura 156 y en la Tabla 124.



**Figura 156.** Evolución de la resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-2-pentanol con lipasa de *Pseudomonas cepacia* libre e inmovilizada sobre poli(BGMPME-co-DVB)-5.

Como se observa en esta Figura, el proceso de resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-2-propanol con la enzima inmovilizada (50% de conversión en 24 horas) resultó mucho más rápido que con la enzima libre (24% de conversión en 24 horas). Este fenómeno puede deberse, como se comentó previamente, a efectos estabilizantes<sup>33</sup> y efectos de hiperactivación<sup>550-553</sup> originados por el proceso de inmovilización-estabilización enzimática.

**Tabla 124.** Resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-2-pentanol con lipasa de *Pseudomonas cepacia*.

Biocatalizador (mg enzima)	Masa enzima (mg)	Tiempo reacción (h)	Conversión (%)	Conversión isómero R (%)	Conversión isómero S (%)	U <sub>e</sub> <sup>a</sup> (μmol/h mg enz.)	Y <sub>a</sub> <sup>b</sup> (%)
Enzima libre	1.2	24	24	24	0	3	100
poli(BGMPME-co-DVB)-5	0.54	24	50	50	0	15	500

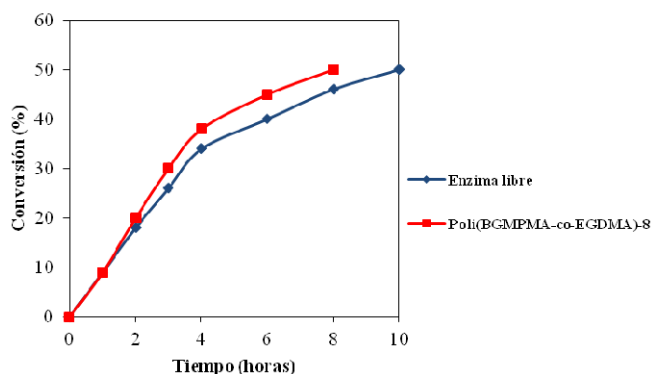
<sup>a</sup> Actividad específica efectiva (U<sub>e</sub>): (η<sub>rac</sub> x C) / (t x m<sub>enz</sub>), donde η<sub>rac</sub>: μmoles de reactivo racémico; C: conversión de la resolución cinética expresada en tanto por uno; t: tiempo de reacción (horas); m<sub>enz</sub>: mg enzima empleados en la resolución cinética.

<sup>b</sup> Rendimiento de actividad (Y<sub>a</sub>): U<sub>e,n</sub> / U<sub>e,ref</sub>, donde U<sub>e,n</sub>: actividad específica efectiva de cada caso; U<sub>e,ref</sub>: actividad específica efectiva del caso de la enzima libre en hexano.

Como se observa en esta Tabla, esta enzima al contrario que la lipasa de *Pseudomonas fluorescens*, es capaz de reconocer exclusivamente en enantiómero (*R*-).

### 5.5.2.1.4.3. Resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-2-pentanol con lipasa de *Pseudomonas stutzeri*.

Se realizó un estudio comparativo de la resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-1-pentanol entre la enzima libre, 5 mg de preparado enzimático (0.8 mg de enzima, 105 U<sub>mg</sub><sup>-1</sup>) y la enzima inmovilizada, 48 mg del derivado inmovilizado poli (BGMPMA-*co*-EGDMA)-8 (0.8 mg de enzima, 87 U<sub>mg</sub><sup>-1</sup>), llevando a cabo el procedimiento experimental descrito en el apartado 6.4.2.1.4.3. Los resultados obtenidos en dicho estudio se presentan en la Figura 157 y en la Tabla 125.



**Figura 157.** Evolución de la resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-2-pentanol con lipasa de *Pseudomonas stutzeri* libre e inmovilizada sobre poli(BGMPMA-*co*-EGDMA)-8.

Como se observa en esta Figura, el proceso resolutivo con la enzima inmovilizada (50% de conversión en 8 horas) es más rápido que con la enzima libre (50% de conversión en 10 horas). En este proceso se observa una pequeña activación de la enzima inmovilizada, posiblemente por efectos estabilizantes<sup>33</sup> originados por la inmovilización enzimática.

**Tabla 125.** Resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-2-pentanol con lipasa de *Pseudomonas stutzeri*.

Biocatalizador (mg enzima)	Masa enzima (mg)	Tiempo reacción (h)	Conversión (%)	Conversión isómero R (%)	Conversión isómero S (%)	U <sub>e</sub> <sup>a</sup> (μmol/h mg enz.)	Y <sub>a</sub> <sup>b</sup> (%)
Enzima libre	0.8	10	50	50	0	25	100
poli(BGMPMA- <i>co</i> -EGDMA)-8	0.8	8	50	50	0	31	125

<sup>a</sup> Actividad específica efectiva (U<sub>e</sub>): (η<sub>rac</sub> × C) / (t × m<sub>enz</sub>), donde η<sub>rac</sub>: μmoles de reactivo racémico; C: conversión de la resolución cinética expresada en tanto por uno; t: tiempo de reacción (horas); m<sub>enz</sub>: mg enzima empleados en la resolución cinética.

<sup>b</sup> Rendimiento de actividad (Y<sub>a</sub>): U<sub>e,n</sub> / U<sub>e,ref</sub>, donde U<sub>e,n</sub>: actividad específica efectiva de cada caso; U<sub>e,ref</sub>: actividad específica efectiva del caso de la enzima libre en hexano.

Como se observa en esta Tabla, esta enzima al igual que la lipasa de *Pseudomonas cepacia*, es capaz de reconocer exclusivamente en enantiómero (*R*-).

#### 5.5.2.1.4.4. Resumen comparativo de la resolución cinética enzimática de (*R*, *S*)-1-fenil-2-pentanol con diferentes lipasas.

A continuación se presenta en la Tabla 126 un resumen de los resultados obtenidos en la resolución cinética enzimática, de (*R*, *S*)-1-fenil-2-pentanol, con las diferentes enzimas empleadas. En esta Tabla también se han incluido los resultados publicados por otros grupos de investigación en el mismo proceso resolutivo.

**Tabla 126.** Resultados obtenidos en la resolución cinética enzimática de (*R*, *S*)-1-fenil-2-pentanol.

Lipasa empleada	N°	Biocatalizador	Conversión (%)	e.e. producto (%)	E <sup>a</sup>	Productividad (mmol p./mg enzima horas)
<i>Ps. fluorescens</i>	1	Enzima libre	46	57	17	$3.8 \times 10^{-2}$
		poli(GMA-co-HDDMA)-2	64	53	15	$8.9 \times 10^{-2}$
<i>Ps. cepacia</i>	1	Enzima libre	24	>99	>200	$3.3 \times 10^{-3}$
		poli(BGMPME-co-DVB)-5	50	>99	>200	$1.5 \times 10^{-2}$
<i>Ps. stutzeri</i>	1	Enzima libre	50	>99	>200	$2.5 \times 10^{-2}$
		poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8	50	>99	>200	$3.1 \times 10^{-2}$
<i>Carica papaya</i>	2 <sup>562</sup>	Enzima libre	47	>99	>200	$8 \times 10^{-4}$

<sup>a</sup>  $E = \{\ln[ee_p(1 - ee_s)]/(ee_p + ee_s)\} / \{\ln[ee_p(1 + ee_s)]/(ee_p + ee_s)\}$ .

1. Condiciones de reacción: 1.5 mL de hexano, 0.4 mmol de (*R*, *S*)-1-fenil-2-pentanol y 1.2 mmol de butirato de vinilo. T<sup>a</sup>: 25°C, 200 r.p.m.

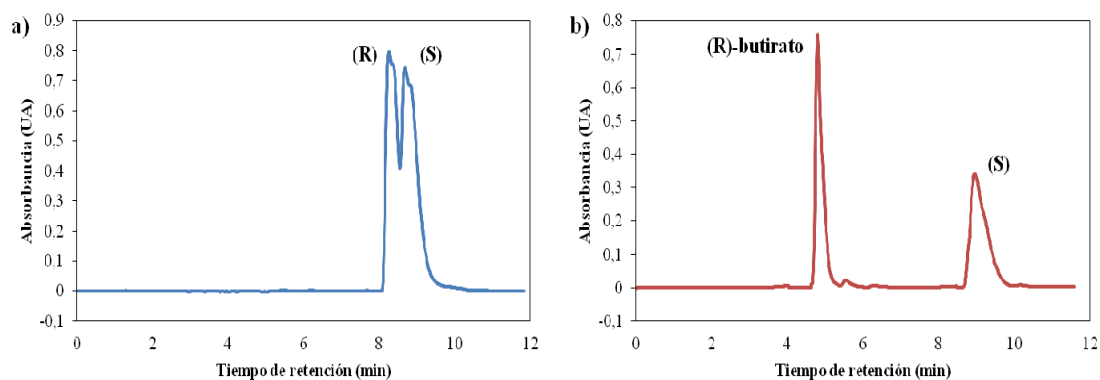
2.<sup>562</sup> Condiciones de reacción: 0.8 mL de ciclohexano, 0.1 mmol de (*R*, *S*)-1-fenil-2-pentanol y 0.4 mmol de hexanoato de vinilo. T<sup>a</sup>: 45°C.

Como se puede observar en esta Tabla, la enzima que presenta mayor productividad en la resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-2-pentanol es la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* inmovilizada sobre el soporte poli(GMA-co-HDDMA)-2 ( $8.9 \times 10^{-2}$  mmol/mg enzima hora), sin embargo no da lugar a buenos excesos enantioméricos. Por tanto, la enzima que da lugar a los mejores resultados en la lipasa de *Pseudomonas stutzeri* inmovilizada sobre poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8 ( $3.1 \times 10^{-2}$  mmol/mg enzima hora).

#### 5.5.2.1.4.5. Caracterización del producto obtenido en la resolución cinética enzimática de (*R*, *S*)-1-fenil-2-pentanol: (*R*)-butirato de 1-fenil-2-pentilo (40).

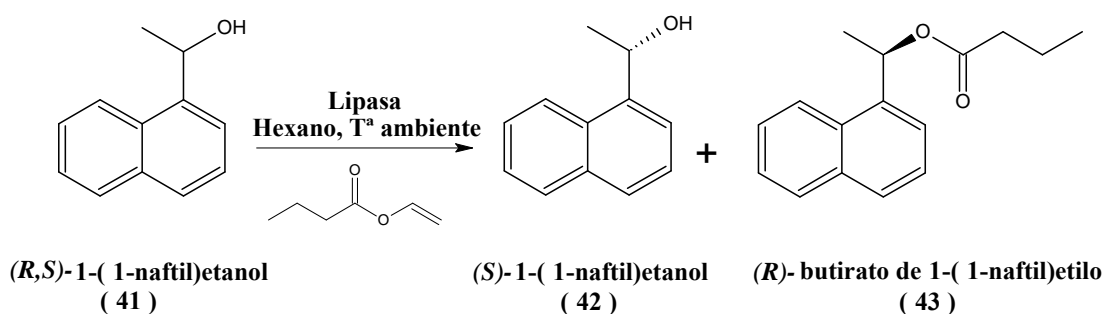
La evolución de las reacciones se llevó a cabo mediante el análisis de muestras tomadas a diferentes tiempos en HPLC. En la Figura 158 se pueden observar los cromatogramas obtenidos al inicio y al final del proceso de resolución cinética.

La identificación del producto como (*R*)-butirato de 1-fenil-2-pentilo (40) se realizó por evaluación del tiempo de retención y del poder óptico rotatorio del producto, y su espectro de RMN una vez aislado y purificado. La asignación de las señales del espectro de RMN-<sup>1</sup>H y del espectro de RMN-<sup>13</sup>C, aparecen en la Parte Experimental.



**Figura 158.** Cromatogramas de la resolución cinética de *(R, S)*-1-fenil-2-pentanol. a) Cromatograma del reactivo inicial, *(R, S)*-1-fenil-2-pentanol. b) Cromatograma una vez concluido el proceso de resolución cinética.

#### 5.5.2.1.5. Resolución cinética de *(R, S)*-1-(1-naftil) etanol (41).



**Esquema 69.** Resolución cinética de *(R, S)*-1-(1-naftil) (41) etanol catalizada por lipasas.

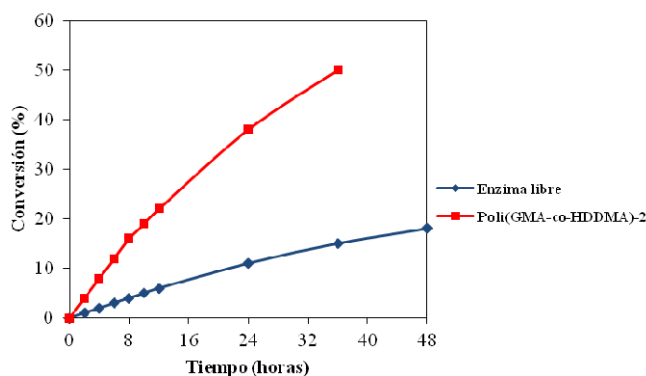
El *(R, S)*-1-(1-naftil) etanol, es otro sustrato muy empleado en resoluciones cinéticas enzimáticas.<sup>563-568</sup> La resolución cinética se llevó a cabo siguiendo el procedimiento experimental descrito en el apartado 6.4.2.1.5 y el producto obtenido presentó una configuración absoluta *R*-, de acuerdo a la regla de Kazlauskas.<sup>87</sup>

##### 5.5.2.1.5.1. Resolución cinética de *(R, S)*-1-(1-naftil) etanol con lipasa de *Pseudomonas fluorescens*.

Se llevó a cabo la resolución cinética de *(R, S)*-1-(1-naftil) etanol (procedimiento experimental descrito en el apartado 6.4.2.1.5.1.) con 102 mg de preparado enzimático (1.2 mg de enzima, 611 U $\text{mg}^{-1}$ ) y 100 mg del derivado inmovilizado poli(GMA-*co*-HDDMA)-2 (1.2 mg de enzima, 519 U $\text{mg}^{-1}$ ). Los resultados obtenidos en dicho estudio se presentan en la Figura 159 y en la Tabla 127.

Como se observa en la Figura 159, el proceso de resolución cinética de *(R, S)*-1-(1-naftil) etanol con la enzima inmovilizada (50% de conversión en 36 horas) resultó mucho más rápido que con la enzima libre (18% de conversión en 48 horas). Este fenómeno, como se explica con

anterioridad, podría ser debido a efectos estabilizantes<sup>33</sup> y efectos de hiperactivación<sup>550-553</sup> originados por el proceso de inmovilización-estabilización enzimática.



**Figura 159.** Evolución de la resolución cinética de *(R, S)*-1-(1-naftil) etanol con lipasa de *Pseudomonas fluorescens* libre e inmovilizada sobre poli(GMA-co-HDDMA)-2.

**Tabla 127.** Resolución cinética de *(R, S)*-1-(1-naftil) etanol con lipasa de *Pseudomonas fluorescens*.

Biocatalizador (mg enzima)	Masa enzima (mg)	Tiempo reacción (h)	Conversión (%)	Conversión isómero R (%)	Conversión isómero S (%)	$U_e^a$ ( $\mu\text{mol/h mg enz.}$ )	$Y_a^b$ (%)
Enzima libre	1.2	48	18	18	0	0.3	100
poli(GMA-co-HDDMA)-2	1.2	36	50	50	0	1.2	417

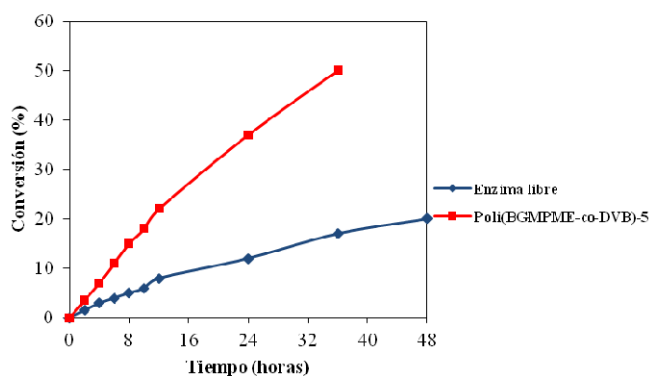
<sup>a</sup> Actividad específica efectiva ( $U_e$ ):  $(\eta_{\text{rac}} \times C) / (t \times m_{\text{enz}})$ , donde  $\eta_{\text{rac}}$ :  $\mu\text{moles}$  de reactivo racémico; C: conversión de la resolución cinética expresada en tanto por uno; t: tiempo de reacción (horas);  $m_{\text{enz}}$ : mg enzima empleados en la resolución cinética.

<sup>b</sup> Rendimiento de actividad ( $Y_a$ ):  $U_{e,n} / U_{e,\text{ref}}$ , donde  $U_{e,n}$ : actividad específica efectiva de cada caso;  $U_{e,\text{ref}}$ : actividad específica efectiva del caso de la enzima libre en hexano.

#### 5.5.2.1.5.2. Resolución cinética de *(R, S)*-1-(1-naftil) etanol con lipasa de *Pseudomonas cepacia*.

La resolución cinética de *(R, S)*-1-(1-naftil) etanol se llevó a cabo siguiendo el procedimiento experimental descrito en el apartado 6.4.2.1.5.2. Para ello se emplearon 225 mg de preparado enzimático (3.0 mg de enzima, 232  $\text{Umg}^{-1}$ ) y 70 mg del derivado inmovilizado poli (BGMPME-co-DVB)-5 (1.25 mg de enzima, 200  $\text{Umg}^{-1}$ ). Los resultados obtenidos en dicho estudio se presentan en la Figura 160 y en la Tabla 128.

Como se observa en esta Figura, el proceso de resolución cinética de *(R, S)*-1-(1-naftil) etanol con la enzima inmovilizada (50% de conversión en 36 horas) resultó mucho más rápido que con la enzima libre (20% de conversión en 48 horas). Este fenómeno puede deberse, como se comentó previamente, a efectos estabilizantes<sup>33</sup> y efectos de hiperactivación<sup>550-553</sup> originados por el proceso de inmovilización-estabilización enzimática.



**Figura 160.** Evolución de la resolución cinética de (*R, S*)-1-(1-naftil) etanol con lipasa de *Pseudomonas cepacia* libre e inmovilizada sobre poli(BGMPME-co-DVB)-5.

**Tabla 128.** Resolución cinética de (*R, S*)-1-(1-naftil) etanol con lipasa de *Pseudomonas cepacia*.

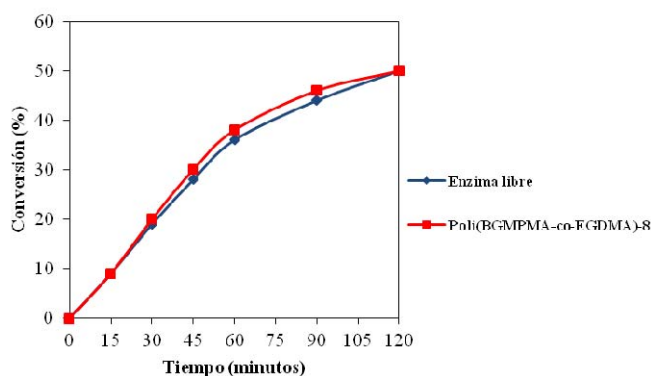
Biocatalizador (mg enzima)	Masa enzima (mg)	Tiempo reacción (h)	Conversión (%)	Conversión isómero R (%)	Conversión isómero S (%)	$U_e^a$ ( $\mu\text{mol/h mg enz.}$ )	$Y_a^b$ (%)
Enzima libre	3.0	48	20	20	0	0.14	100
poli(BGMPME-co-DVB)-5	1.25	36	50	50	0	1.11	794

<sup>a</sup> Actividad específica efectiva ( $U_e$ ):  $(\eta_{\text{rac}} \times C) / (t \times m_{\text{enz}})$ , donde  $\eta_{\text{rac}}$ :  $\mu\text{moles}$  de reactivo racémico; C: conversión de la resolución cinética expresada en tanto por uno; t: tiempo de reacción (horas);  $m_{\text{enz}}$ : mg enzima empleados en la resolución cinética.

<sup>b</sup> Rendimiento de actividad ( $Y_a$ ):  $U_{e,n} / U_{e,\text{ref}}$ , donde  $U_{e,n}$ : actividad específica efectiva de cada caso;  $U_{e,\text{ref}}$ : actividad específica efectiva del caso de la enzima libre en hexano.

### 5.5.2.1.5.3. Resolución cinética de (*R, S*)-1-(1-naftil) etanol con lipasa de *Pseudomonas stutzeri*.

Siguiendo el procedimiento experimental descrito en el apartado 6.4.2.1.5.3, se llevo a cabo la resolución cinética de (*R, S*)-1-(1-naftil) etanol empleando 5 mg de preparado enzimático ( $0.8 \text{ mg}$  de enzima,  $105 \text{ U mg}^{-1}$ ) y 48 mg del derivado inmovilizado poli (BGMPMA-co-EGDMA)-8 ( $0.8 \text{ mg}$  de enzima,  $87 \text{ U mg}^{-1}$ ). Los resultados obtenidos en dicho estudio se presentan en la Figura 161 y en la Tabla 129.



**Figura 161.** Evolución de la resolución cinética de (*R, S*)-1-(1-naftil) etanol con lipasa de *Pseudomonas stutzeri* libre e inmovilizada sobre poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8.



Como se observa en esta Figura tanto la enzima inmovilizada como la enzima libre presentan la misma cinética, alcanzando un 50% de conversión tras 2 horas de reacción empleándose la misma cantidad de enzima. En este proceso se observa una pequeña activación de la enzima inmovilizada (posiblemente por efectos estabilizantes <sup>33</sup> originados por la inmovilización enzimática) ya que se empleó menos unidades catalíticas (69.8 U) que en el caso de la enzima libre (84 U).

**Tabla 129.** Resolución cinética de (*R, S*)-1-(1-naftil) etanol con lipasa de *Pseudomonas stutzeri*.

Biocatalizador (mg enzima)	Masa enzima (mg)	Tiempo reacción (h)	Conversión (%)	Conversión isómero R (%)	Conversión isómero S (%)	U <sub>e</sub> <sup>a</sup> (μmol/h mg enz.)	Y <sub>a</sub> <sup>b</sup> (%)
Enzima libre	0.8	2	50	50	0	31	100
poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8	0.8	2	50	50	0	31	100

<sup>a</sup> Actividad específica efectiva (U<sub>e</sub>): ( $\eta_{rac} \times C$ ) / (t x m<sub>enz</sub>), donde  $\eta_{rac}$ : μmoles de reactivo racémico; C: conversión de la resolución cinética expresada en tanto por uno; t: tiempo de reacción (horas); m<sub>enz</sub>: mg enzima empleados en la resolución cinética.

<sup>b</sup> Rendimiento de actividad (Y<sub>a</sub>): U<sub>e,n</sub> / U<sub>e,ref</sub>, donde U<sub>e,n</sub>: actividad específica efectiva de cada caso; U<sub>e,ref</sub>: actividad específica efectiva del caso de la enzima libre en hexano.

#### 5.5.2.1.5.4. Resumen comparativo de la resolución cinética enzimática de (*R, S*)-1-(1-naftil) etanol con diferentes lipasas.

A continuación se presenta en la Tabla 130 un resumen de los resultados obtenidos en la resolución cinética enzimática, de (*R,S*)-1-(1-naftil) etanol, con las diferentes enzimas empleadas. En esta Tabla también se han incluido los resultados publicados por otros grupos de investigación en la misma resolución cinética.

Como se puede observar en esta Tabla, la enzima que presenta mayor productividad en la resolución cinética de (*R, S*)-1-(1-naftil) etanol es la lipasa de *Pseudomonas stutzeri* (3.1x10<sup>-2</sup> mmol/mg enzima hora).

**Tabla 131.** Resultados obtenidos en la resolución cinética de (*R, S*)-1-(1-naftil) etanol.

Enzima empleada	Nº	Biocatalizador	Conversión (%)	e.e. producto (%)	E <sup>a</sup>	Productividad (mmol p. /mg enzima horas)
<i>Ps. fluorescens</i>	1	Enzima libre	9	>99	>200	3x10 <sup>-4</sup>
		poli(GMA-co-HDDMA)-2	36	>99	>200	1.3x10 <sup>-3</sup>
	2 <sup>566</sup>	Enzima libre	28	-	2	6x10 <sup>-6</sup>
<i>Ps. cepacia</i>	1	Enzima libre	10	>99	>200	1.4x10 <sup>-4</sup>
		poli(BGMPME-co-DVB)-5	34	>99	>200	1.1x10 <sup>-3</sup>
	2 <sup>566</sup>	Enzima libre	41	-	2	8x10 <sup>-6</sup>
	6 <sup>568</sup>	PS-CII	53	89	123	-
<i>Ps. stutzeri</i>	1	Enzima libre	50	>99	>200	3.1x10 <sup>-2</sup>
		poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8	50	>99	>200	3.1x10 <sup>-2</sup>
<i>Candida antarctica B</i>	3 <sup>564</sup>	Enzima libre	50	>99	>500	7x10 <sup>-4</sup>
	5 <sup>567</sup>	Enzima libre	5	91	23	1.4x10 <sup>-5</sup>
	6 <sup>568</sup>	Novozyme 435	49	>99	>200	-
Aminoacilasa de <i>Aspergillus melleus</i>	4 <sup>565</sup>	Enzima libre	25	>99	>500	2.4x10 <sup>-4</sup>
<i>Candida antarctica</i>	2 <sup>566</sup>	Enzima libre	52	-	57	1.5x10 <sup>-4</sup>

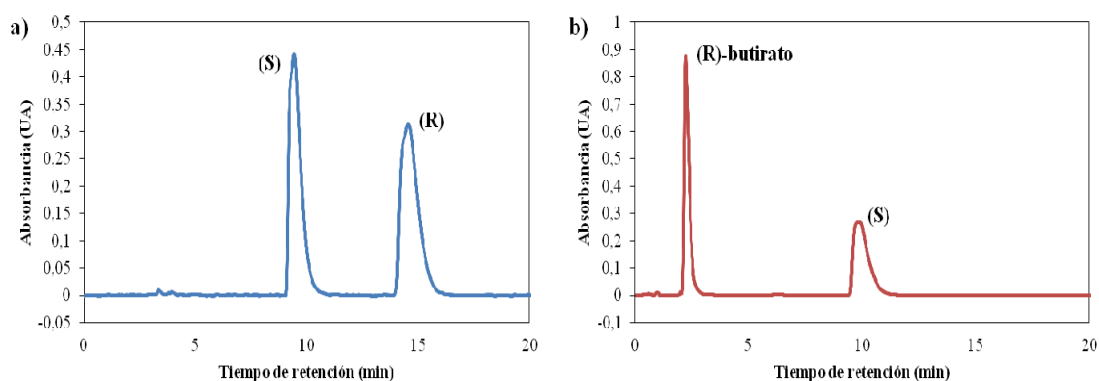
<sup>a</sup> E = {ln[ $e_P(1 - e_S)$ ]/( $e_P + e_S$ )} / {ln[ $e_P(1 + e_S)$ ]/( $e_P + e_S$ )}.

1. Condiciones de reacción: 1.5 mL de hexano, 0.1 mmol de (*R, S*)-1-(1-naftil) etanol y 0.4 mmol de butirato de vinilo. T<sup>a</sup>: 25°C, 200 r.p.m.

- 2.<sup>566</sup> Condiciones de reacción: 25 mL isopropil éter, 10 mmol de (*R, S*)-1-(1-naftil) etanol y 10 mmol de diceteno. T<sup>a</sup>: 25°C.
- 3.<sup>564</sup> Condiciones de reacción: 10 mL de dietil éter, 2 mmol de (*R, S*)-1-(1-naftil) etanol y 4 mmol de acetato de vinilo. T<sup>a</sup>: 25°C.
- 4.<sup>565</sup> Condiciones de reacción: 5 mL de hexano, 0.8 mmol de (*R, S*)-1-(1-naftil) etanol y 1.2 mmol de acetato de vinilo. T<sup>a</sup>: 25°C.
- 5.<sup>567</sup> Condiciones de reacción: 5 mL de dietil éter, 1 mmol de (*R, S*)-1-(1-naftil) etanol y 1 mmol de anhídrido succínico. T<sup>a</sup>: 25°C.
- 6.<sup>568</sup> Condiciones de reacción: 5 mL de disolventes fluorados, 0.5 mmol de (*R, S*)-1-(1-naftil) etanol y 5 mmol de acetato de vinilo. T<sup>a</sup>: 25°C.

#### 5.5.2.1.5.5. Caracterización del producto obtenido en la resolución cinética enzimática de (*R, S*)-1-(1-naftil) etanol: (*R*)-butirato de 1-(1-naftil) etilo (**43**).

La evolución de las reacciones se llevó a cabo mediante el análisis de muestras tomadas a diferentes tiempos en HPLC (Figura 162).



**Figura 162.** Cromatogramas de la resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-1-propanol. a) Cromatograma del reactivo inicial, (*R, S*)-1-(1-naftil) etanol. b) Cromatograma una vez concluido el proceso de resolución cinética.

La identificación del producto como (*R*)-butirato de 1-(1-naftil) etilo (**43**) se realizó por evaluación del tiempo de retención y del poder óptico rotatorio del producto y su espectro de RMN una vez aislado y purificado. La asignación de las señales del espectro de RMN-<sup>1</sup>H y del espectro de RMN-<sup>13</sup>C, aparecen en la Parte Experimental.

#### 5.5.2.1.6. Resolución cinética de (*R, S*)-1,2-diaril-2-hidroxicetonas con lipasa de *Pseudomonas stutzeri*.

Tomando como referencia la Memoria de Tesis Doctoral de Pilar Hoyos<sup>476</sup> y sus publicaciones,<sup>474, 477-479</sup> se llevó a cabo la resolución cinética de varias  $\alpha$ -hidroxicetonas aromáticas (Esquema 71), recogidas en la Tabla 132. En esta Memoria<sup>476</sup> se realizó una exhaustiva búsqueda del biocatalizador y optimización del proceso de resolución cinética de (*R, S*)-1,2-diaril-2-hidroxicetonas.

En dichos estudios se evaluaron:

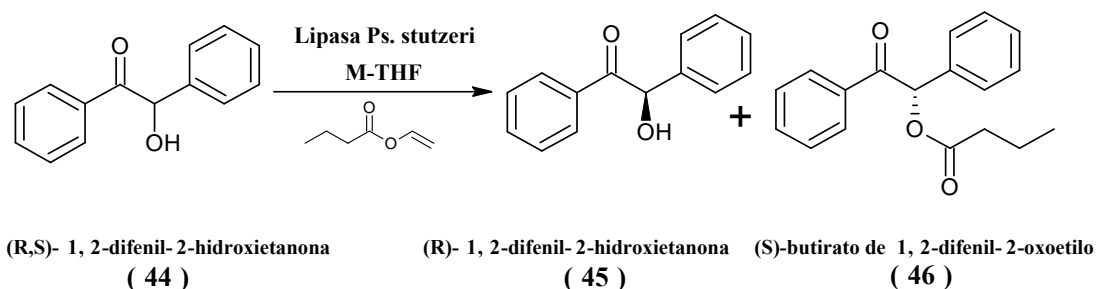
- **Disolventes:** Hexano, tolueno, Isooctano, decano, cloroformo, t-butil metil éter, éter dietílico, tetrahidrofurano y metiltetrahidrofurano.
- **Biocatalizador:** lipasa B de *Candida antarctica*, lipasa de *Thermomyces lanuginosa*, lipasa de *Rhizomucor miehei*, lipasa de *Pseudomonas cepacia* y lipasa de *Pseudomonas stutzeri*.
- **Agente acilante:** acetato de vinilo y butirato de vinilo.

Las condiciones de reacción empleadas en esta memoria de tesis para llevar a cabo la resolución cinética de (*R, S*)-1,2-difenil-2-hidroxicetonas son las condiciones óptimas que derivan de todos los procesos de optimización llevados a cabo por Pilar Hoyos.<sup>474, 476-479</sup>

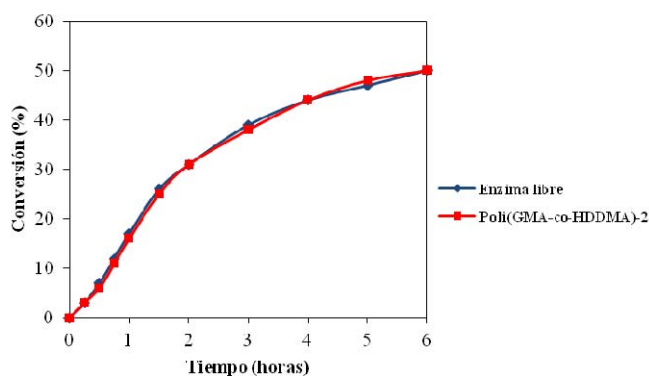
Este estudio comenzó con la resolución cinética de la (*R, S*)-1,2-difenil-2-hidroxiacetona, para verificar el funcionamiento del derivado inmovilizado y los tiempos de reacción, siguiendo el procedimiento experimental descrito en el apartado 6.4.2.1.6.1.

Para llevar a cabo la resolución cinética de la (*R, S*)-1,2-difenil-2-hidroxiacetona, se seleccionó el derivado inmovilizado obtenido en la inmovilización enzimática de la lipasa de *Pseudomonas stutzeri* sobre poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8, ya que fue el derivado inmovilizado que presentaba una mayor actividad enzimática (83% respecto a la enzima libre, 87U/mg) y una mayor carga enzimática (16.8mg enzima/g de soporte). Este derivado inmovilizado no fue capaz de completar la resolución cinética debido a que (como se observó experimentalmente) el soporte absorbía disolvente (metil-THF), lo que provocaba el hinchamiento del polímero y la pérdida de actividad del derivado inmovilizado. Por lo que se decidió probar con el derivado inmovilizado que presentó la segunda mejor actividad enzimática, el poli(GMA-co-HDDMA)-2 (80% respecto a la enzima libre, 84U/mg, 15.6 mg de enzima/g de soporte). Este derivado inmovilizado no se vio afectado por el disolvente y fue capaz de completar la resolución cinética de la (*R, S*)-1,2-difenil-2-hidroxiacetona. Por lo que fue el derivado empleado en todas las resoluciones cinéticas de (*R, S*)-1,2-difenil-2-hidroxicetonas.

Los resultados obtenidos en la resolución cinética de (*R, S*)-1,2-difenil-2-hidroxiacetona (Esquema 70) con el derivado inmovilizado poli(GMA-co-HDDMA)-2 aparecen reflejados en la tabla 113 y el progreso de la resolución cinética puede observarse en la Figura 163.

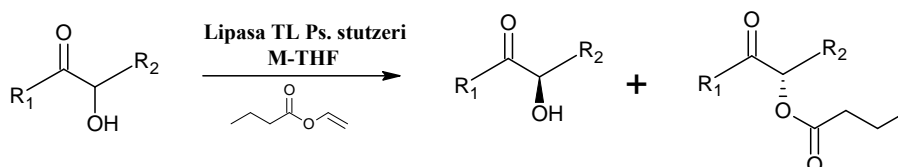


**Esquema 70.** Resolución cinética de (*R, S*)-1,2-difenil-2-hidroxiacetona (44).



**Figura 163.** Resolución cinética de  $(R, S)$ -1,2-difenil-2-hidroxiacetona catalizada por la lipasa de *Pseudomonas stutzeri* libre e inmovilizada sobre poli(GMA-co-HDDMA)-2.

Como se puede observar en la Figura 163, la cinética de la resolución cinética de la enzima inmovilizada es prácticamente idéntica a la de la enzima libre, alcanzándose en ambos casos el 50% de conversión en 6 horas. En este proceso se observa una pequeña activación de la enzima inmovilizada (posiblemente por efectos estabilizantes <sup>33</sup> originados por la inmovilización enzimática) ya que se empleó menor cantidad de enzima con menor actividad catalítica (3.12 mg, 262 U) que en el caso de la enzima libre (3.2mg, 336 U).



**Esquema 71.** Resolución cinética de  $(R, S)$ -1,2-diaril-2-hidroxiacetona.

**Tabla 132.**  $(R, S)$ -1,2-diaril-2-hidroxiacetona utilizadas como sustratos de la KR catalizada por la lipasa de *Pseudomonas stutzeri*.

Sustrato	R1	R2	Producto
$(R,S)$ -1,2-difenil-2-hidroxiacetona ( <b>44</b> )	fenilo	fenilo	$(S)$ -butirato de 1,2-difenil-2-oxoetilo ( <b>46</b> )
$(R,S)$ -1,2-bis(4-metoxifenil)-2-hidroxiacetona ( <b>47</b> )	4-metoxifenilo	4-metoxifenilo	$(S)$ -butirato de 1,2-bis(4-metoxifenil)-2-oxoetilo ( <b>49</b> )
$(R,S)$ -1,2-bis(4-isopropilfenil)-2-hidroxiacetona ( <b>50</b> )	4-isopropilfenilo	4-isopropilfenilo	$(S)$ -butirato de 1,2-bis(4-isopropilfenil)-2-oxoetilo ( <b>52</b> )
$(R,S)$ -1-(4-etoxifenil)-2-fenil-2-hidroxiacetona ( <b>53</b> )	fenilo	4-etoxifenilo	$(S)$ -butirato de 1-(4-etoxifenil)-2-fenil-2-oxoetilo ( <b>55</b> )
$(R,S)$ -2-(4-etoxifenil)-1-fenil-2-hidroxiacetona ( <b>56</b> )	4-etoxifenilo	fenilo	$(S)$ -butirato de 2-(4-etoxifenil)-1-fenil-2-oxoetilo ( <b>58</b> )
$(R,S)$ -1-(3,4-diclorofenil)-2-fenil-2-hidroxiacetona ( <b>59</b> )	fenilo	3,4-diclorofenilo	$(S)$ -butirato de 1-(3,4-diclorofenil)-2-fenil-2-oxoetilo ( <b>61</b> )
$(R,S)$ -2-(3,4-diclorofenil)-1-fenil-2-hidroxiacetona ( <b>62</b> )	3,4-diclorofenilo	fenilo	$(S)$ -butirato de 2-(3,4-diclorofenil)-1-fenil-2-oxoetilo ( <b>64</b> )
$(R,S)$ -1,2-bis(2-furil)-2-hidroxiacetona ( <b>65</b> )	2-furanilo	2-furilo	$(S)$ -butirato de de 1,2-bis(2-furil)-2-oxoetilo ( <b>67</b> )
$(R,S)$ -2-hidroxi-1,2-bis(3-tenil)-2-etanona ( <b>68</b> )	3-tenilo	3-tenilo	$(S)$ -butirato de de 1,2-bis(3-tenil)-2-oxoetilo ( <b>70</b> )

Para llevar a cabo las resoluciones cinéticas de estas  $(R, S)$ -1,2-diaril-2-hidroxiacetona se siguió el procedimiento experimental que aparece descrito en el apartado 6.4.2.1.6. En todas

estas resoluciones se ha empleado la misma cantidad tanto de la enzima libre como del derivado enzimático inmovilizado. Los resultados correspondientes a la conversión y excesos enantioméricos del producto, obtenidos en dichas resoluciones cinéticas aparecen reflejados en la Tabla 133. Como puede observarse en esta Tabla, estos resultados pueden considerarse excelentes en un proceso de resolución cinética y en la gran mayoría de los casos el valor del cociente enantiomérico *E* es superior a 200.

**Tabla 133.** Resultados obtenidos en las resoluciones cinéticas de diferentes (*R*, *S*)-1,2-diaril-2-hidroxicetonas.

Sustrato	Enzima (mg)	Tiempo (horas)	Conversión (%)	e.e. del producto	E <sup>a</sup>	Productividad (mmol p. /mg enzima horas)
(R,S)-1,2-difenil-2-hidroxicetona (44)	Libre (3.2 mg)	6	50	>99	200	2.45x10 <sup>-3</sup>
	Inmovilizada(3.12 mg)	6	50	>99	200	2.51x10 <sup>-3</sup>
(R,S)-1,2-bis(4-metoxifenil)-2-hidroxicetona (47)	Libre (3.2 mg)	8	50	>99	200	1.84x10 <sup>-3</sup>
	Inmovilizada(3.12 mg)	8	50	>99	200	1.88x10 <sup>-3</sup>
(R,S)-1,2-bis(4-isopropilfenil)-2-hidroxicetona (50)	Libre (3.2 mg)	8	49	>99	200	1.80x10 <sup>-3</sup>
	Inmovilizada(3.12 mg)	8	48	>99	200	1.81x10 <sup>-3</sup>
(R,S)-1-(4-etoxifenil)-2-fenil-2-hidroxicetona (53)	Libre (3.2 mg)	8	50	>99	200	1.84x10 <sup>-3</sup>
	Inmovilizada(3.12 mg)	8	49	>99	200	1.85x10 <sup>-3</sup>
(R,S)-2-(4-etoxifenil)-1-fenil-2-hidroxicetona (56)	Libre (3.2 mg)	8	49	>99	200	1.80x10 <sup>-3</sup>
	Inmovilizada(3.12 mg)	8	48	>99	200	1.81x10 <sup>-3</sup>
(R,S)-1-(3,4-diclorofenil)-2-fenil-2-hidroxicetona (59)	Libre (3.2 mg)	8	50	>99	200	1.84x10 <sup>-3</sup>
	Inmovilizada(3.12 mg)	8	49	>99	200	1.85x10 <sup>-3</sup>
(R,S)-2-(3,4-diclorofenil)-1-fenil-2-hidroxicetona (62)	Libre (3.2 mg)	8	49	>99	200	1.81x10 <sup>-3</sup>
	Inmovilizada(3.12 mg)	8	49	>99	200	1.85x10 <sup>-3</sup>
(R,S)-1,2-bis(2-furil)-2-hidroxicetona (65)	Libre (3.2 mg)	8	48	95	113	1.76x10 <sup>-3</sup>
	Inmovilizada(3.12 mg)	8	47	95	125	1.77x10 <sup>-3</sup>
(R,S)-1,2-bis(3-tenil)-2-hidroxi etanona (68)	Libre (3.2 mg)	8	48	>99	200	1.76x10 <sup>-3</sup>
	Inmovilizada(3.12 mg)	8	48	>99	200	1.81x10 <sup>-3</sup>

#### 5.5.2.1.6.1. Estudio comparativo de los resultados obtenidos en la resolución cinética de diferentes (*R*, *S*)-1,2-diaril-2-hidroxicetonas frente a los resultados obtenidos por otros grupos de investigación.

En la Tabla 134 se pueden observar un estudio comparativo de los resultados obtenidos en esta memoria frente a los resultados publicados con anterioridad sobre la resolución cinética de diferentes (*R*, *S*)-1,2-diaril-2-hidroxicetonas empleando la lipasa de *Pseudomonas stutzeri*. En este estudio hay que tener en cuenta que los diferentes lotes de la lipasa TL<sup>®</sup> de *Pseudomonas stutzeri*, presentaron diferentes purezas y actividades enzimáticas.<sup>476</sup>

**Tabla 134.** Estudio comparativo de la resolución cinética dinámica de diferentes (*R, S*)-1,2-diaril-2-hidroxicetonas empleando la lipasa de *Pseudomonas stutzeri*.

Sustrato	Nº	Enzima (mg)	Conversión (%)	e.e. del producto	E	Productividad (mmol p./mg enzima hora)
<i>(R,S)</i> -1,2-difenil-2-hidroxi etanona	1	Libre	50	>99	200	2.45x10 <sup>-3</sup>
		poli(GMA- <i>co</i> -HDDMA)-2	50	>99	200	2.51x10 <sup>-3</sup>
	2 <sup>477</sup>	Libre a)	45	>99	200	2.60x10 <sup>-4</sup>
		Libre b)	49	>99	200	2.83x10 <sup>-4</sup>
		Libre c)	50	>99	200	1.73x10 <sup>-3</sup>
	3 <sup>474</sup>	Lip TL-SG1	17	>99	200	1.70x10 <sup>-3</sup>
		Lip TL-SG2	28	>99	200	3.00x10 <sup>-3</sup>
		Lip TL-SS	49	>99	200	1.20x10 <sup>-3</sup>
		Lip TL-SE	25	>99	200	7.29x10 <sup>-3</sup>
	4 <sup>478</sup>	Libre a)	39	>99	200	1.79x10 <sup>-3</sup>
Libre b)		49	>99	200	2.29x10 <sup>-3</sup>	
<i>(R,S)</i> -1,2-bis(4-metoxifenil)-2-hidroxi etanona	1	Libre	50	>99	200	1.84x10 <sup>-3</sup>
		poli(GMA- <i>co</i> -HDDMA)-2	50	>99	200	1.88x10 <sup>-3</sup>
	2 <sup>477</sup>	Libre d)	49	>99	200	1.13x10 <sup>-3</sup>
<i>(R,S)</i> -1,2-bis(4-isopropilfenil)-2-hidroxi etanona	1	Libre	49	>99	200	1.80x10 <sup>-3</sup>
		poli(GMA- <i>co</i> -HDDMA)-2	48	>99	200	1.81x10 <sup>-3</sup>
<i>(R,S)</i> -1-(4-etoxifenil)-2-fenil-2-hidroxi etanona	1	Libre	50	>99	200	1.84x10 <sup>-3</sup>
		poli(GMA- <i>co</i> -HDDMA)-2	49	>99	200	1.85x10 <sup>-3</sup>
5 <sup>479</sup>	Libre	47	>99	200	1.72x10 <sup>-3</sup>	
		49	>99	200	1.80x10 <sup>-3</sup>	
<i>(R,S)</i> -2-(4-etoxifenil)-1-fenil-2-hidroxi etanona	1	Libre	49	>99	200	1.80x10 <sup>-3</sup>
		poli(GMA- <i>co</i> -HDDMA)-2	48	>99	200	1.81x10 <sup>-3</sup>
	5 <sup>479</sup>	Libre	25	>99	200	9.20x10 <sup>-4</sup>
<i>(R,S)</i> -1-(3,4-diclorofenil)-2-fenil-2-hidroxi etanona	1	Libre	50	>99	200	1.84x10 <sup>-3</sup>
		poli(GMA- <i>co</i> -HDDMA)-2	49	>99	200	1.85x10 <sup>-3</sup>
	5 <sup>479</sup>	Libre	49	>99	200	1.80x10 <sup>-3</sup>
<i>(R,S)</i> -2-(3,4-diclorofenil)-1-fenil-2-hidroxi etanona	1	Libre	49	>99	200	1.81x10 <sup>-3</sup>
		poli(GMA- <i>co</i> -HDDMA)-2	49	>99	200	1.85x10 <sup>-3</sup>
	5 <sup>479</sup>	Libre	49	>99	200	1.80x10 <sup>-3</sup>
<i>(R,S)</i> -1,2-bis(2-furil)-2-hidroxi etanona	1	Libre	48	95	113	1.76x10 <sup>-3</sup>
		poli(GMA- <i>co</i> -HDDMA)-2	47	95	125	1.77x10 <sup>-3</sup>
	2 <sup>477</sup>	Libre a)	48	95	113	2.77x10 <sup>-4</sup>
		Libre b)	49	95	125	2.83x10 <sup>-4</sup>
<i>(R,S)</i> -1,2-bis(3-tenil)-2-hidroxi etanona	1	Libre	48	>99	200	1.76x10 <sup>-3</sup>
		poli(GMA- <i>co</i> -HDDMA)-2	48	>99	200	1.81x10 <sup>-3</sup>
	2 <sup>477</sup>	Libre a)	42	94	66	2.42x10 <sup>-4</sup>
		Libre d)	49	>99	200	1.13x10 <sup>-3</sup>

1. Condiciones de reacción: 0.094 mmol sustrato, 0.28 mmol butirato de vinilo, 1.5 mL Me-THF, 3.2 mg enzima libre ó 3.12 mg enzima inmovilizada sobre poli(GMA-*co*-HDDMA)-2, T<sup>a</sup> ambiente, 6-8 horas, 200 r.p.m.

2.<sup>477</sup> Condiciones de reacción: 0.471 mmol sustrato, 2.82 mmol butirato de vinilo, 5 mL THF, 34 mg enzima libre: a) T<sup>a</sup> ambiente, 24 horas; b) 37°C, 24 horas; c) 50°C, 4 horas.

3.<sup>474</sup> Condiciones de reacción: 0.14 mmol sustrato, 1.42 mmol butirato de vinilo, 1.5 mL THF, T<sup>a</sup> ambiente, 24 horas, enzima inmovilizada: a) Lip TL-SG1: 0.58 mg enzima; b) Lip TL-SG2: 0.54 mg enzima; c) Lip TL-SS: 2.3 mg enzima; d) Lip TL-SE: 0.2 mg enzima.

4.<sup>478</sup> Condiciones de reacción: 0.094 mmol sustrato, 0.56 mmol butirato de vinilo, T<sup>a</sup> ambiente, 3 horas, 6.8 mg enzima libre, a) 1 mL THF; b) 1 mL Me-THF.

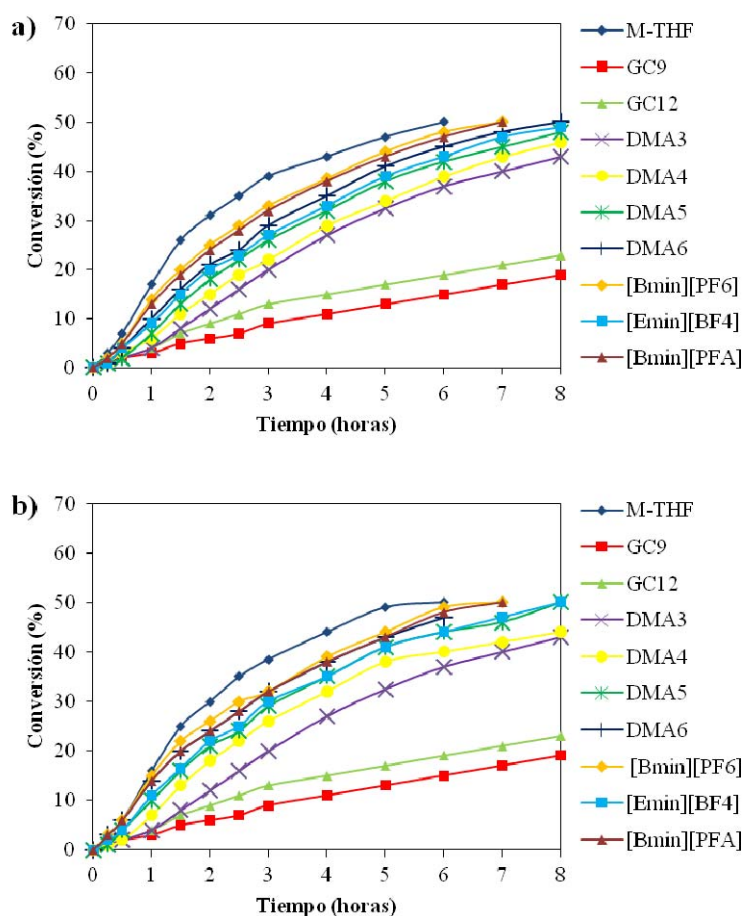
5.<sup>479</sup> Condiciones de reacción: 0.1 mmol sustrato, 0.6 mmol butirato de vinilo, 1 mL THF, 6.8 mg enzima, T<sup>a</sup> ambiente, 4 horas.

Como se puede observar en esta Tabla, las resoluciones cinéticas que se presentan en esta memoria de tesis y que se llevaron a cabo con el derivado inmovilizado poli(GMA-*co*-HDDMA)-2 mejoran los datos de productividad obtenidos por otros grupos de investigación en todos los casos excepto en el caso de la (*R,S*)-1,2-difenil-2-hidroxi etanona. En este caso los

resultados obtenidos en esta memoria con poli(GMA-co-HDDMA)-2 ( $2.51 \times 10^{-3}$  mmol / mg enzima hora) fueron superados por la entrada n° 3<sup>474</sup> con la Lip TL-SE ( $7.29 \times 10^{-3}$  mmol/mg enzima hora), en la que se empleó la lipasa de *Pseudomonas stutzeri* inmovilizada por adsorción sobre diferentes siliconas modificadas.

#### 5.5.2.1.6.2. Resolución cinética de (R, S)-1,2-difenil-2-hidroxietanona con lipasa de *Pseudomonas stutzeri* en presencia de disolventes sostenibles.

Se estudió la influencia de los disolventes sostenibles en el proceso de resolución cinética del (R, S)-1,2-difenil-2-hidroxietanona siguiendo el procedimiento experimental descrito en el apartado 6.4.2.1.6.1.1. Para ello se emplearon mezclas de metil-tetrahidrofurano 2 mM de disolventes provenientes de biomasa (GC9, GC12, DMA4, DMA5 y DMA6), y mezclas de metil-tetrahidrofurano al 30% en líquido iónico ([Bmin] [PF<sub>6</sub>], [Emin] [BF<sub>4</sub>] y [Bmin] [PAF]). Los resultados obtenidos en este estudio se pueden observar en la Figura 164, y en la Tabla 135 se presenta un estudio comparativo de los resultados obtenidos en los procesos de resolución cinética empleando disolventes sostenibles respecto a la resolución cinética en hexano.



**Figura 164.** Progreso de la resolución cinética de (R, S)-1,2-difenil-2-hidroxietanona catalizada por la lipasa de *Pseudomonas stutzeri* en presencia de disolventes sostenibles: a) Enzima libre. b) Enzima inmovilizada sobre poli(GMA-co-HDDMA)-2.

**Tabla 135.** Influencia de los disolventes sostenibles sobre el proceso de resolución cinética de (*R, S*)-1,2-difenil-2-hidroxietanona.

Biocatalizador (mg enzima)	Disolvente	Tiempo reacción (h)	Conversión (%)	Conversión isómero R (%)	Conversión isómero S (%)	U <sub>e</sub> <sup>a</sup> (μmol/h mg enz.)	Y <sub>a</sub> <sup>b</sup> (%)
Enzima libre (0.16 mg)	M-THF	6	50	50	0	49	100
	GC9	6	15	15	0	15	30
	GC12	6	19	19	0	19	38
	DMA3	6	37	37	0	36	74
	DMA4	6	39	39	0	38	78
	DMA5	6	42	42	0	41	84
	DMA6	6	45	45	0	44	90
	[Bmin][PF <sub>6</sub> ]	6	48	48	0	47	96
	[Emin][BF <sub>4</sub> ]	6	43	43	0	42	86
	[Bmin][PFA]	6	47	47	0	46	94
poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8 (0.17 mg)	M-THF	6	50	50	0	46	94
	GC9	6	16	16	0	16	32
	GC12	6	20	20	0	20	40
	DMA3	6	37	37	0	36	74
	DMA4	6	40	40	0	39	80
	DMA5	6	44	44	0	43	88
	DMA6	6	47	47	0	46	94
	[Bmin][PF <sub>6</sub> ]	6	49	49	0	48	98
	[Emin][BF <sub>4</sub> ]	6	44	44	0	43	88
	[Bmin][PFA]	6	48	48	0	47	96

<sup>a</sup> Actividad específica efectiva (U<sub>e</sub>): ( $\eta_{rac} \times C$ ) / (t x m<sub>enz</sub>), donde  $\eta_{rac}$ : μmoles de reactivo racémico; C: conversión de la resolución cinética expresada en tanto por uno; t: tiempo de reacción (horas); m<sub>enz</sub>: mg enzima empleados en la resolución cinética.

<sup>b</sup> Rendimiento de actividad (Y<sub>a</sub>): U<sub>e,n</sub> / U<sub>e,ref</sub>, donde U<sub>e,n</sub>: actividad específica efectiva de cada caso; U<sub>e,ref</sub>: actividad específica efectiva del caso de la enzima libre en hexano.

Como se puede observar en la Figura 164 y en la Tabla 135, el empleo de disolventes sostenibles no supone ninguna mejora en este proceso resolutivo. En los resultados obtenidos se pueden observar dos tendencias:

1. Disolventes sostenibles derivados de biomasa: la velocidad de reacción del proceso resolutivo aumenta al disminuir la polaridad del disolvente sostenible empleado.
2. Líquidos iónicos: dan lugar a una velocidad de reacción y una conversión muy similar al metil-tetrahidrofurano. En este caso, los líquidos iónicos no originan una pérdida de selectividad como sucedía en el caso de la resolución cinética del (*R, S*)-1-fenil-1-etanol.

### 5.5.2.1.6.3. Reutilización de la lipasa de *Pseudomonas stutzeri* inmovilizada sobre poli(GMA-co-HDDMA)-2 en la resolución cinética de (*R, S*)-1,2-difenil-2-hidroxietanona.

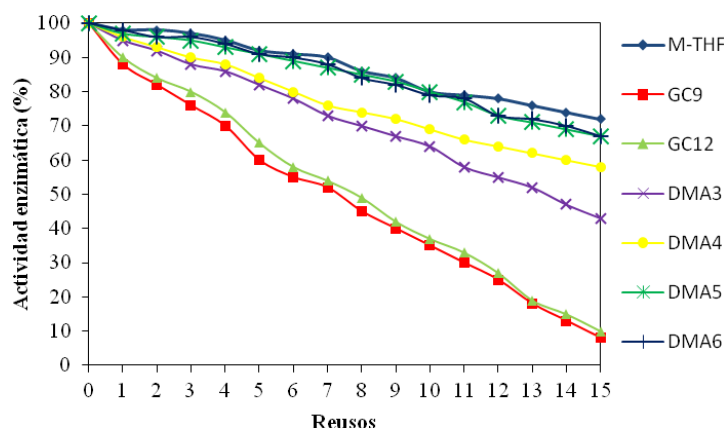
El estudio de la reusabilidad de la lipasa de *Pseudomonas stutzeri* inmovilizada sobre poli(GMA-co-HDDMA)-2 en la resolución cinética de (*R,S*)-1,2-difenil-2-hidroxietanona, se llevo a cabo siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.4.2.1.6.1.2 empleando como sustrato patrón la (*R, S*)-1,2-difenil-2-hidroxietanona. Los resultados obtenidos en dicho estudio a parecen reflejados en la Figura 165.

Como se puede observar en esta Figura, el derivado inmovilizado presentó una mayor estabilidad en metil-tetrahidrofurano (72% actividad enzimática después de 15 reusos) y su estabilidad disminuyó según aumentó la polaridad del disolvente sostenible empleado. Este



fenómeno se debe principalmente a que al aumentar la polaridad del disolvente sostenible empleado, disminuye la velocidad del proceso de resolución cinética (ver polaridades de disolventes sostenibles en el apartado 5.5.1.1.1, Tabla 105), y por lo tanto aumenta el tiempo empleado en cada reuso.

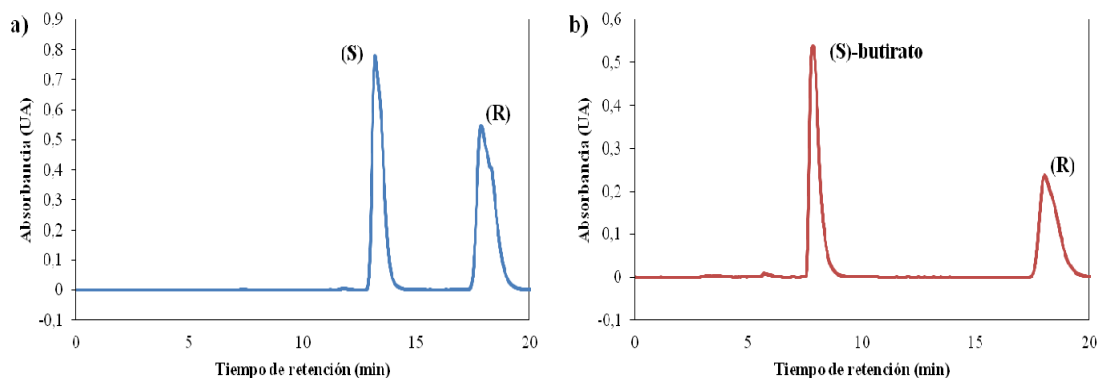
Ninguno de los trabajos publicados por otros autores sobre la resolución cinética de (*R*, *S*)-1,2-diaril-2-hidroxicetonas aportan datos de reusabilidad del derivado inmovilizado.<sup>474, 477-479</sup>



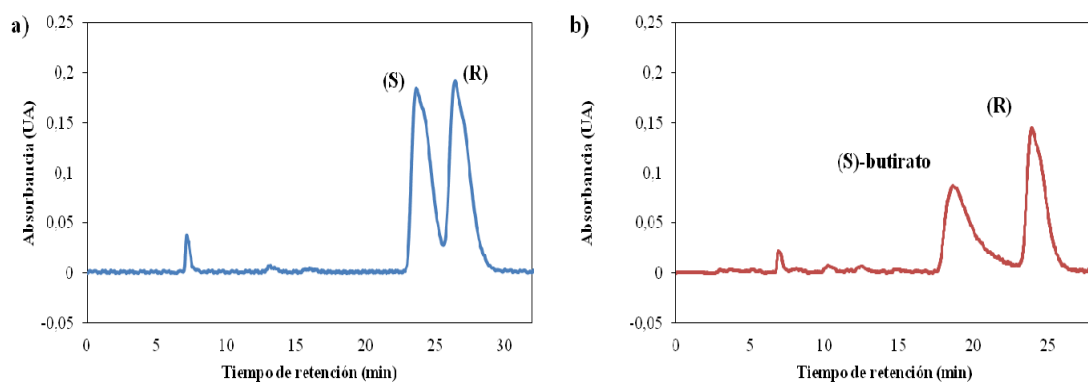
**Figura 165.** Reutilización de la lipasa de *Pseudomonas stutzeri* inmovilizada sobre poli(GMA-co-HDDMA)-2 en la resolución cinética de (*R*, *S*)-1,2-difenil-2-hidroxiacetona.

#### 5.5.2.1.6.4. Caracterización de los productos obtenidos en la resolución cinética de (*R*, *S*)-1,2-diaril-2-hidroxiacetona.

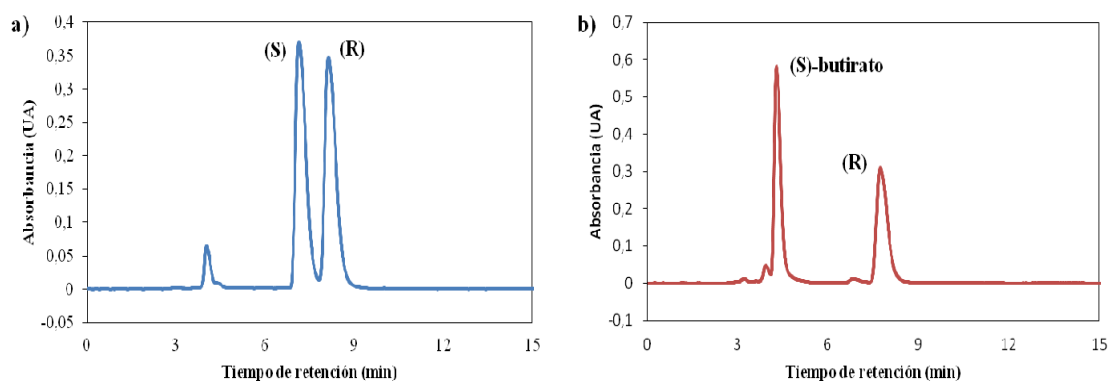
La evolución de las reacciones se llevó a cabo mediante el análisis de muestras tomadas a diferentes tiempos en HPLC. En las Figuras 166-174 se pueden observar los cromatogramas obtenidos al inicio y al final del proceso de resolución cinética.



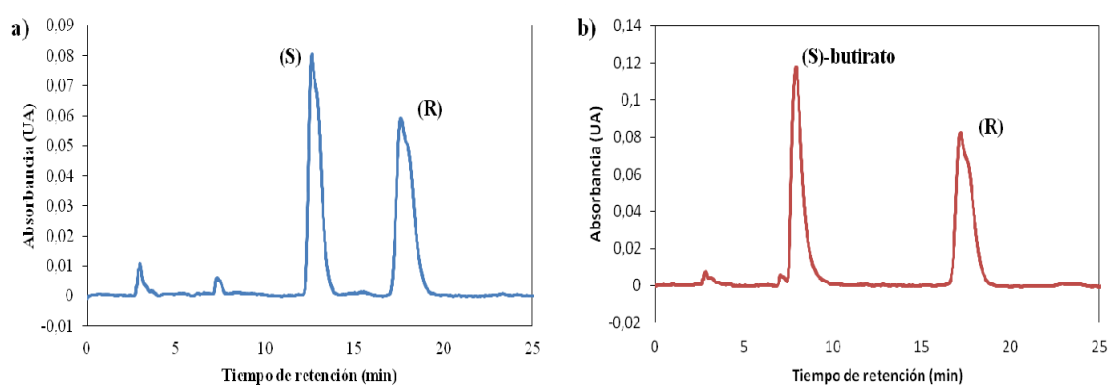
**Figura 166.** Cromatogramas de la resolución cinética de (*R*, *S*)-1,2-difenil-2-hidroxiacetona. a) Cromatograma del reactivo inicial. b) Cromatograma una vez concluido el proceso de resolución cinética.



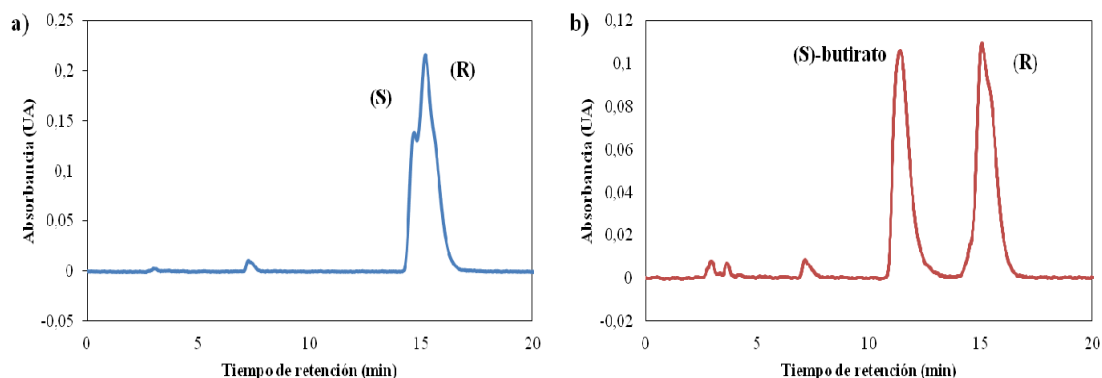
**Figura 167.** Cromatogramas de la resolución cinética de  $(R, S)$ -1,2-bis (4-metoxifenil)-2-hidroxi-tanona. a) Cromatograma del reactivo inicial. b) Cromatograma una vez concluido el proceso de resolución cinética.



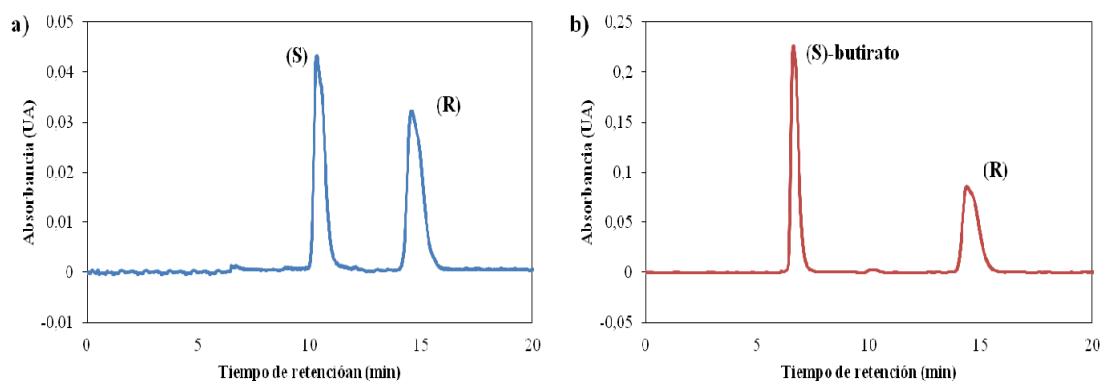
**Figura 168.** Cromatogramas de la resolución cinética de  $(R, S)$ -1,2-bis (4-isopropilfenil)-2-hidroxi-tanona. a) Cromatograma del reactivo inicial. b) Cromatograma una vez concluido el proceso de resolución cinética.



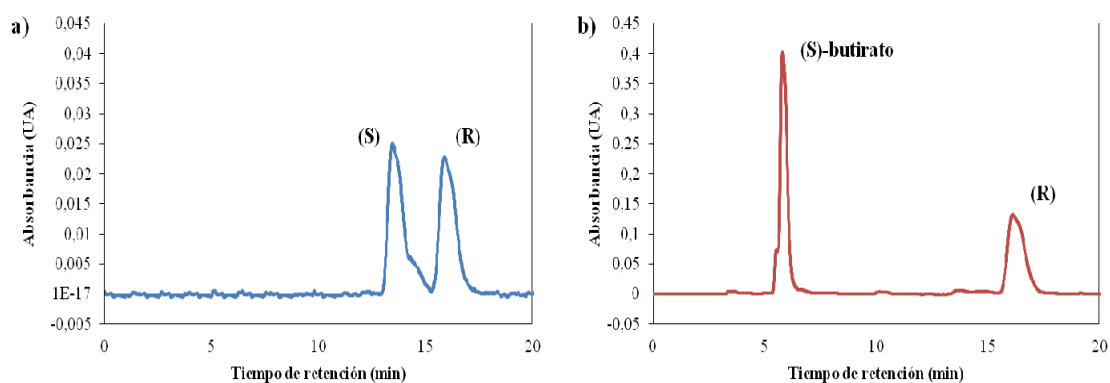
**Figura 169.** Cromatogramas de la resolución cinética de  $(R, S)$ -1-(4-etoxifenil)-2-fenil-2-hidroxi-tanona. a) Cromatograma del reactivo inicial. b) Cromatograma una vez concluido el proceso de resolución cinética.



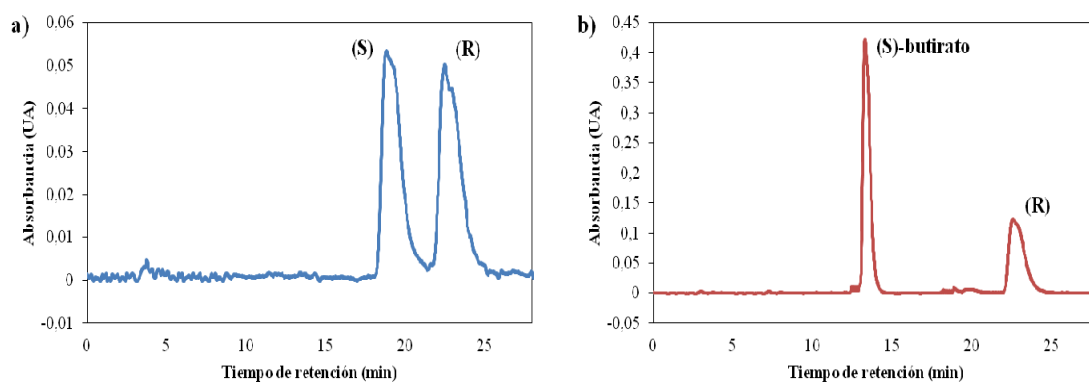
**Figura 170.** Cromatogramas de la resolución cinética de  $(R, S)$ -2-(4-etoxifenil)-2-fenil-2-hidroxi-etanona. a) Cromatograma del reactivo inicial. b) Cromatograma una vez concluido el proceso de resolución cinética.



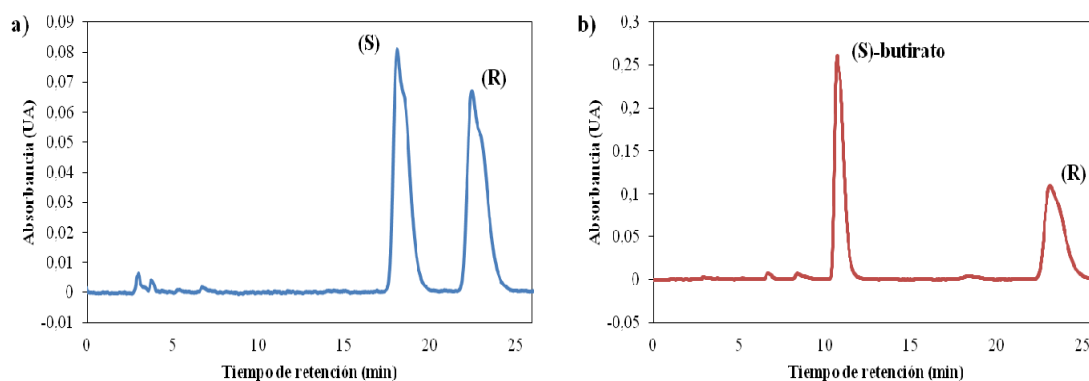
**Figura 171.** Cromatogramas de la resolución cinética de  $(R, S)$ -1-(3,4-diclorofenil)-2-fenil-2-hidroxi-etanona. a) Cromatograma del reactivo inicial. b) Cromatograma una vez concluido el proceso de resolución cinética.



**Figura 172.** Cromatogramas de la resolución cinética de  $(R, S)$ -2-(3,4-diclorofenil)-2-fenil-2-hidroxi-etanona. a) Cromatograma del reactivo inicial. b) Cromatograma una vez concluido el proceso de resolución cinética.



**Figura 173.** Cromatogramas de la resolución cinética de *(R, S)*-1,2-bis (2-furil)-2-hidroxitetana. a) Cromatograma del reactivo inicial. b) Cromatograma una vez concluido el proceso de resolución cinética.



**Figura 174.** Cromatogramas de la resolución cinética de *(R, S)*-1,2-bis (3-tenoil)-2-hidroxitetana. a) Cromatograma del reactivo inicial. b) Cromatograma una vez concluido el proceso de resolución cinética.

La identificación de los productos se realizó por comparación del tiempo de retención y del poder óptico rotatorio del producto con resultados obtenidos por otros grupos de investigación,<sup>474, 476-479</sup> y su espectro de RMN una vez aislado y purificado. La asignación de las señales del espectro de RMN-<sup>1</sup>H y del espectro de RMN-<sup>13</sup>C, aparecen en la Parte Experimental.

### 5.5.2.2. Resoluciones cinéticas dinámicas.

La limitación intrínseca de los procesos de resolución cinética, que es la obtención de una máxima conversión del 50 %, puede ser solucionada mediante la combinación de este proceso con la racemización del enantiómero remanente del sustrato, de forma que el enantiómero por el que la enzima presenta mayor afinidad pueda ser continuamente transformado, hasta una conversión total del sustrato.

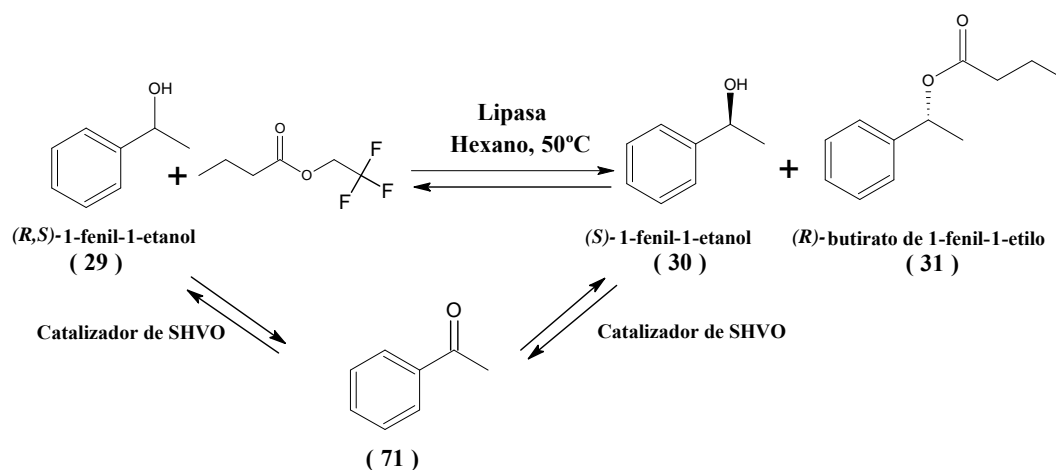
Los tres requisitos básicos para llevar a cabo un proceso de resolución cinética-dinámica (DKR) son:

- Un proceso de resolución cinética eficaz.
- La velocidad de racemización del sustrato debe ser superior a la velocidad de conversión del mismo.
- Los procesos de resolución cinética y de racemización deben ser compatibles.

Estos tres requisitos se cumplieron optimizando los procesos de resolución cinética, verificando que la velocidad de racemización fuera superior a la velocidad de conversión del mismo, sustituyendo el agente acilante (de butirato de vinilo a butirato de trifluoroetilo), con el que se produce una ralentización en el proceso de resolución cinética y empleando el catalizador de racemización adecuado es este tipo de reacciones. Este último factor y las condiciones óptimas para llevar a cabo las resoluciones cinéticas-dinámicas, se eligieron teniendo en cuenta los datos publicados por otros autores.<sup>474, 476-479</sup>

En base a los resultados obtenidos en el proceso de resolución cinética del (*R, S*)-1-fenil-1-etanol, se decidió no emplear los disolventes sostenibles en la resolución cinética-dinámica de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol debido a que no mejoraban los resultados obtenidos con el disolvente convencional, incluso algunos, originaban pérdidas de selectividad en el proceso resolutivo.

#### 5.5.2.2.1. Resolución cinética dinámica de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol (29) por combinación de lipasas y el catalizador de SHVO.



**Esquema 72.** Resolución cinética dinámica de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol por combinación de lipasas y el catalizador de Shvo.

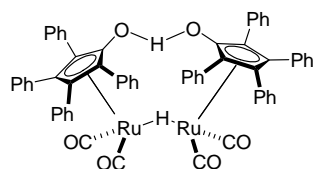
Se llevó a cabo un estudio comparativo de la resolución cinética-dinámica de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol por combinación de cada uno de los derivados inmovilizados que presentaron mejor actividad enzimática como se indicó en los apartados anteriores (*Ps. fluorescens* en poli(GMA-*co*-HDDMA)-2, *Ps. cepacia* en poli(BGMPME-*co*-DVB)-5 y *Ps. stutzeri* poli(BGMPMA-*co*-EGDMA)-8) y el catalizador de Shvo (Esquema 72). Este catalizador

conduce a la racemización de alcoholes secundarios mediante un proceso de oxidación-reducción.

En base a los resultados obtenidos en el proceso de resolución cinética del (*R, S*)-1-fenil-1-etanol, se decidió no emplear los disolventes sostenibles en la resolución cinética-dinámica de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol debido a que no mejoraban los resultados obtenidos con el disolvente convencional, incluso originaban pérdidas de selectividad en el proceso resolutivo.

El catalizador de Shvo ha sido ampliamente utilizado en combinación de procesos biocatalíticos de resolución cinética de otros alcoholes secundarios, obteniéndose elevadas conversiones, próximas al 100 %, y excesos enantioméricos.<sup>143</sup> Lipasas como la CALB o la lipasa de *Pseudomonas cepacia* han demostrado ser totalmente compatibles con este catalizador, pudiéndose desarrollar el proceso de DKR en un solo paso.<sup>125, 126</sup>

Como ya se detalló en el capítulo de Introducción, este catalizador de rutenio, sintetizado por Shvo y colaboradores,<sup>127</sup> (Figura 175) es un complejo dimérico que debe monomerizarse a elevada temperatura para encontrarse en su forma activa.



**Figura 175.** Catalizador de Shvo.

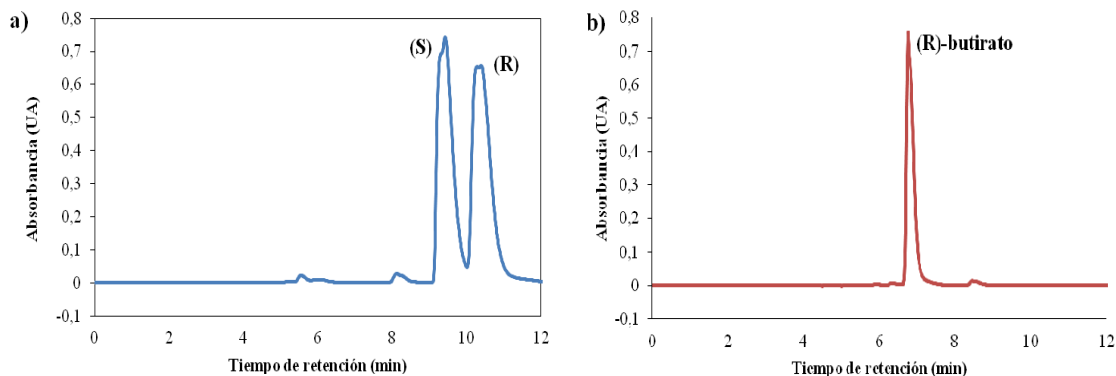
La DKR se realizó siguiendo el procedimiento experimental descrito en el apartado 6.4.2.2.1. Los resultados obtenidos en las resoluciones cinéticas-dinámicas aparecen reflejados en la Tabla 136.

**Tabla 136.** Resultados obtenidos en las resoluciones cinéticas-dinámicas de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol.

Enzima empleada	Masa enzima (mg)	Tiempo reacción (horas)	Conversión (%)	e.e. producto (%)	E <sup>a</sup>	Productividad (mmol p. /mg enzima hora)
<i>Ps. fluorescens</i> poli(GMA-co-HDDMA)-2	2.4	20	92	>99	>200	7.7x10 <sup>-3</sup>
<i>Ps. cepacia</i> poli(BGMPME-co-DVB)-5	3.12	20	90	>99	>200	5.8x10 <sup>-3</sup>
<i>Ps. stutzeri</i> poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8	3.12	20	95	>99	>200	6.1x10 <sup>-3</sup>

Como se puede observar en esta Tabla, los resultados obtenidos con los tres derivados inmovilizados son muy similares, obteniéndose conversiones superiores al 90%. En cuanto a la productividad, el mejor resultado se obtiene con la lipasa de *Ps. fluorescens* inmovilizada sobre poli(GMA-co-HDDMA)-2 (7.2x10<sup>-2</sup> mmol/mg enzima hora).

La evolución de las reacciones se llevó a cabo mediante el análisis de muestras tomadas a diferentes tiempos en HPLC. En la Figura 176 se pueden observar los cromatogramas obtenidos al inicio y al final del proceso de resolución cinética. En la Figura 176- b), se puede ver el producto de reacción.



**Figura 176.** Cromatogramas de la resolución cinética dinámica de (*R*, *S*)-1-fenil-1-etanol. a) Cromatograma del reactivo inicial. b) Cromatograma una vez concluido el proceso de resolución cinética dinámica.

En este proceso de resolución cinética, además del producto (*R*-butirato de fenil etilo (**31**)), también se origina el producto resultante de la oxidación del fenil etanol, es decir, la acetofenona (**71**). En el espectro de HPLC de producto de reacción (Figura 176-b)), solo se observa el producto de reacción ya que a la longitud de onda seleccionada, no absorbe la acetofenona.

La identificación del producto como (*R*) butirato de 1-fenil-1-etilo (**31**) se realizó por comparación del tiempo de retención y del poder óptico rotatorio del producto con resultados obtenidos por otros grupos de investigación,<sup>458, 459</sup> y su espectro de RMN una vez aislado y purificado. La asignación de las señales del espectro de RMN-<sup>1</sup>H y del espectro de RMN-<sup>13</sup>C, aparecen en la Parte Experimental.

#### 5.5.2.2.1.1. Estudio comparativo de los resultados obtenidos en la DKR de (*R*, *S*)-1-fenil-1-etanol con los resultados publicados por otros grupos de investigación.

En este estudio comparativo se tiene que tener en cuenta que en los distintos trabajos de investigación referenciados pueden variar: la enzima empleada, el agente de racemización y las condiciones de reacción. Por lo que una comparación directa podría dar lugar a errores de interpretación. Los resultados obtenidos en este estudio comparativo aparecen reflejados en la Tabla 137.

**Tabla 137.** Resultados obtenidos en las resoluciones cinéticas-dinámicas de (*R*, *S*)-1-fenil-1-etanol.

Nº	Enzima empleada	Conversión (%)	e.e. producto (%)	E <sup>a</sup>	Productividad (mmol p. /mg enzima hora)		
<b>1</b>	<i>Ps. fluorescens</i> poli(GMA-co-HDDMA)-2	92	>99	>200	7.7x10 <sup>-3</sup>		
	<i>Ps. cepacia</i> poli(BGMPME-co-DVB)-5	90	>99	>200	5.8x10 <sup>-3</sup>		
	<i>Ps. stutzeri</i> poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8	95	>99	>200	6.1x10 <sup>-3</sup>		
<b>2</b> <sup>152</sup>	<i>C. antarctica B</i> Novozyme 435	99	99	-	5.0x10 <sup>-2</sup>		
<b>3</b> <sup>450,451</sup>	<i>C. antarctica B</i> Novozyme 435	90	>99	-	1.0x10 <sup>-3</sup>		
<b>4</b> <sup>340</sup>	<i>C. antarctica B</i> Novozyme 435	79	97	-	2.0x10 <sup>-4</sup>		
<b>5</b> <sup>452</sup>	<i>C. antarctica B</i> Novozyme 435	88	92	-	5.0x10 <sup>-3</sup>		
<b>6</b> <sup>453</sup>	<i>C. antarctica B</i> Novozyme 435	93	>99	-	3.1x10 <sup>-3</sup>		
<b>7</b> <sup>454</sup>	<i>Ps. cepacia</i> Nanopartículas cerámicas (PS CI)	[Ru( <i>p</i> -cymene)Cl <sub>2</sub> ] <sub>2</sub>	hexano	68	91	-	2.2x10 <sup>-4</sup>
			CO <sub>2</sub> s.c.	69	95	-	2.2x10 <sup>-4</sup>
		Nafion SAC 13	hexano	77	77	-	7.1x10 <sup>-3</sup>
			CO <sub>2</sub> s.c.	85	85	-	7.8x10 <sup>-3</sup>
<b>8</b> <sup>455</sup>	<i>C. antarctica B</i> Novozyme 435	98	99	-	2.0x10 <sup>-3</sup>		
<b>9</b> <sup>456</sup>	<i>C. antarctica B</i> Novozyme 435	92	>99	-	5.4x10 <sup>-2</sup>		
<b>10</b> <sup>457</sup>	<i>C. antarctica B</i> CALB-SILLP-11	92	>99	-	-		
<b>11</b> <sup>458</sup>	<i>C. antarctica B</i> Novozyme 435	99	99	-	1.6x10 <sup>-2</sup>		
<b>12</b> <sup>459</sup>	<i>C. antarctica B</i> Novozyme 435	99	99	-	4.6x10 <sup>-2</sup>		

1. Condiciones de reacción: 0.4 mmol de (*R*, *S*)-1-fenil-1-etanol, 1.2 mmol de butirato de trifluoroetilo, 0.02 mmol del catalizador de Shvo y 1.5 mL de hexano; atmósfera inerte (árgon), T<sup>a</sup>: 50 °C, 20 horas, 200 r.p.m. Enzimas (mg): *Ps. fluorescens* (2.4 mg), *Ps. Cepacia* (3.12 mg) y *Ps. Stutzeri* (3.12 mg).

2<sup>152</sup> Condiciones de reacción: 1 mmol de (*R*, *S*)-1-fenil-1-etanol, 1.5 mmol acetato de isoprenilo, 4 mol% de catalizador PS-DVB-Ru-complex, 1 mmol K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 3 mL de tolueno, 1 mg de enzima. T<sup>a</sup>: 25°C, 20 horas.

3<sup>450, 451</sup> Condiciones de reacción: 1.27 mmol de (*R*, *S*)-1-fenil-1-etanol, 20.32 mmol octanoato de vinilo, 413 mg de CP814-E22 (zeolita), 50 mL de agua, 50 mL de octano, 13 mg de enzima. T<sup>a</sup>: 60°C, 8 horas, 300 r.p.m.

4<sup>340</sup> Condiciones de reacción: 0.057 mmol de (*R*, *S*)-1-fenil-1-etanol, 0.432 mmol propionato de vinilo, 5 mg de catalizador SCX, 0.5 mL líquido iónico ([bmim][PF<sub>6</sub>]), CO<sub>2</sub> supercrítico, 6 mg de enzima. T<sup>a</sup>: 40°C, 48 horas.

5<sup>452</sup> Condiciones de reacción: 1 mmol de (*R*, *S*)-1-fenil-1-etanol, 0.432 mmol butirato de vinilo, 50 mg de catalizador Beta zeolita con Si/Al 75–200, 5 mL de tolueno, 3.6 mg de enzima. T<sup>a</sup>: 60°C, 48 horas.

6<sup>453</sup> Condiciones de reacción: 1.27 mmol (*R*, *S*)-1-fenil-1-etanol, 3.81 mmol octanoato de vinilo, 0.2 g catalizador VOSO<sub>4</sub>, 100 mL octano como disolvente, 110 mg de enzima. T<sup>a</sup>: 80°C, 3.5 horas.

7<sup>454</sup> Condiciones de reacción: a) 1.2 mmol(*R*, *S*)-1-fenil-1-etanol, 2.4 mmol acetato de fenilo, 0.6 mmol acetofenona, 0.35 mmol tetrametilpropano diamina, catalizador 0.035 mmol[Ru(*p*-cymene)Cl<sub>2</sub>]<sub>2</sub>, 35 µL dodecano, 26 mg de enzima, hexano ó CO<sub>2</sub> supercrítico como disolvente. T<sup>a</sup>: 55°C, 6 días. b) 1.2 mmol(*R*, *S*)-1-fenil-1-etanol, 2.4 mmol acetato de fenilo, 0.02 mmol de catalizador Nafion SAC 13, 35 µL dodecano, 26 mg de enzima, hexano ó CO<sub>2</sub> supercrítico como disolvente. T<sup>a</sup>: 40°C, 2.5 horas.

8<sup>455</sup> Condiciones de reacción: (*R*, *S*)-1-fenil-1-etanol, propionato de vinilo, catalizador zeolita ácida, CO<sub>2</sub> supercrítico y líquido iónico ([BMIN][PF<sub>6</sub>]) como disolvente. T<sup>a</sup>: 50°C.



9<sup>456</sup> Condiciones de reacción: 1 mol de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol, 1.2 mol de acetato de isoprenilo, 0.5 mmol de catalizador  $\text{Bn}_5\text{CpRu}(\text{CO})_2\text{Cl}$ , 0.1 mol de carbonato sódico, 2 mL 0.25M de ter-butóxido potásico en THF y 450 mL de tolueno; atmósfera inerte (nitrógeno),  $T^a$  ambiente, 6 días y 119 mg de enzima.

10<sup>457</sup> Condiciones de reacción: (*R, S*)-1-fenil-1-etanol, propionato de vinilo, catalizador CP811E-150,  $\text{CO}_2$  supercrítico y líquido iónico ( $[\text{BtmA}][\text{NTf}_2]$ ) como disolvente.  $T^a$ : 50°C.

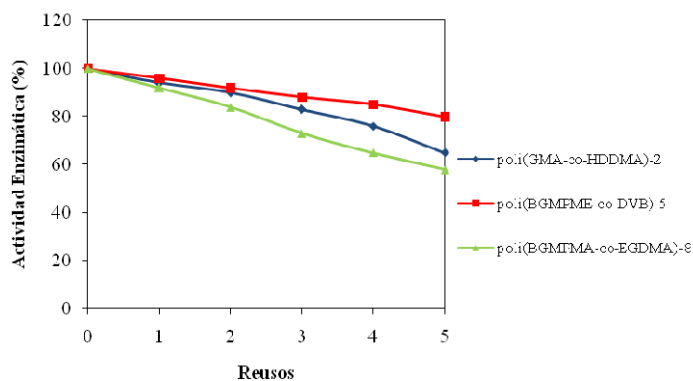
11<sup>458</sup> Condiciones de reacción: 9 mmol (*R, S*)-1-fenil-1-etanol, 18 mmol butirato de isopropilo, 0.5 g de  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , 0.1 % mol de catalizador  $[(\text{Ph}_5\text{Cp})\text{Ru}(\text{CO})_2\text{Cl}]$ , 9 mL de tolueno.  $T^a$ : 70°C, 23 horas, 24 mg de enzima.

12<sup>459</sup> Condiciones de reacción: 8 mmol (*R, S*)-1-fenil-1-etanol, 16 mmol butirato de isopropilo, 0.8 mmol de catalizador  $[(\text{C}_4\text{Ph}_4\text{COHOCC}_4\text{Ph}_4)(\text{I-H})][(\text{CO})_4\text{Ru}_2]$ , 10 mL de tolueno.  $T^a$ : 70°C, 24 horas, 7.2 mg de enzima.

Como puede observarse en esta Tabla, los mejores resultados en cuanto a productividad han sido obtenidos empleando la lipasa de *Candida artartica* B inmovilizada (Novozyme 435) ( $5 \times 10^{-2}$  mmol/ mg enzima hora),<sup>152</sup> mientras que los mejores resultados obtenidos en esta memoria se han logrado con la lipasa de *Ps. fluorescens* ( $7.7 \times 10^{-3}$  mmol/mg enzima hora). En cuanto al grado de conversión obtenido en esta resolución cinética dinámica, existen diversos trabajos en los que se alcanza el 99% de conversión.<sup>152, 458, 459</sup> En esta memoria de tesis se ha alcanzado una conversión de 95% con la lipasa de *Ps. stutzeri* inmovilizada sobre poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8), el 92% con la lipasa de *Ps. fluorescens* inmovilizada sobre poli(GMA-co-HDDMA)-2 y el 90% con la lipasa de *Ps. cepacia* inmovilizada sobre poli(BGMPME-co-DVB)-5.

#### 5.5.2.2.1.2. Reutilización de las lipasas inmovilizadas en la resolución cinética dinámica de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol (29).

El estudio de reutilización de diferentes derivados inmovilizados (lipasa de *Ps. fluorescens* inmovilizada sobre poli(GMA-co-HDDMA)-2, lipasa de *Ps. cepacia* inmovilizada sobre poli(BGMPME-co-DVB)-5 y *Ps. stutzeri* inmovilizada sobre poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8) en la resolución cinética dinámica de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol se llevaron a cabo siguiendo el procedimiento experimental descrito en el apartado 6.4.2.2.1. Los resultados de este estudio se presentan en la Figura 177.

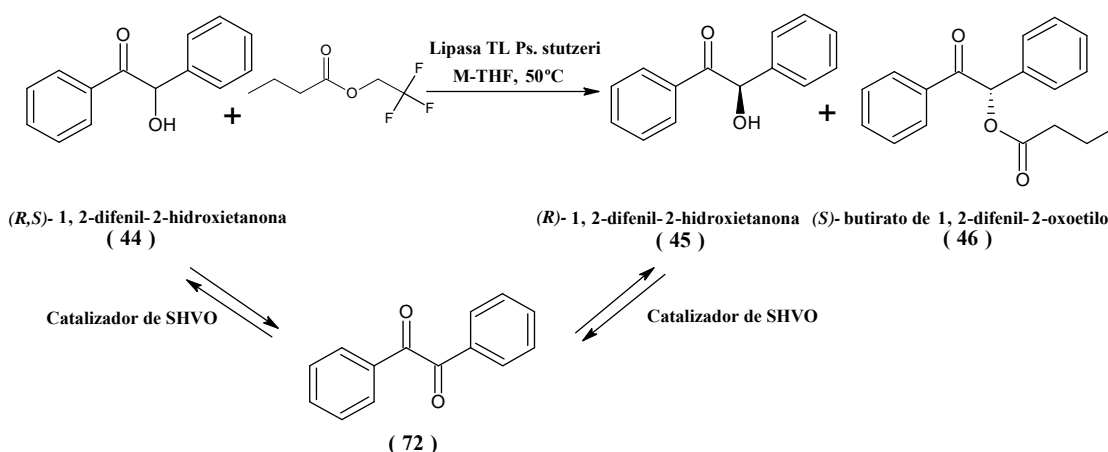


**Figura 177.** Reutilización de los derivados inmovilizados en la resolución cinética dinámica de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol.

Como se puede observar en esta Figura el derivado inmovilizado que presenta mejor estabilidad es el poli(BGMPME-*co*-DVB)-5 (*Ps. cepacia*) reteniendo un 80% de la actividad enzimática tras 5 reusos con una productividad total de 0.63 mmol/mg de enzima, a continuación el poli(GMA-*co*-HDDMA)-2 (*Ps. fluorescens*) reteniendo un 63% de la actividad enzimática con una productividad total de 0.79 mmol/mg de enzima y por último el poli(BGMPME-*co*-EGDEMA)-8 (*Ps. stutzeri*) reteniendo un 58% de la actividad enzimática con una productividad total de 0.56 mmol/mg enzima.

De los trabajos publicados previamente sobre la resolución cinética dinámica de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol, sólo en uno de ellos se emplea una de las enzimas inmovilizadas en esta memoria de tesis.<sup>454</sup> En dicho trabajo, emplean un derivado inmovilizado comercial, el PS C-I, de la lipasa de *Ps. cepacia*, pero no reporta datos sobre acerca de su reutilización.

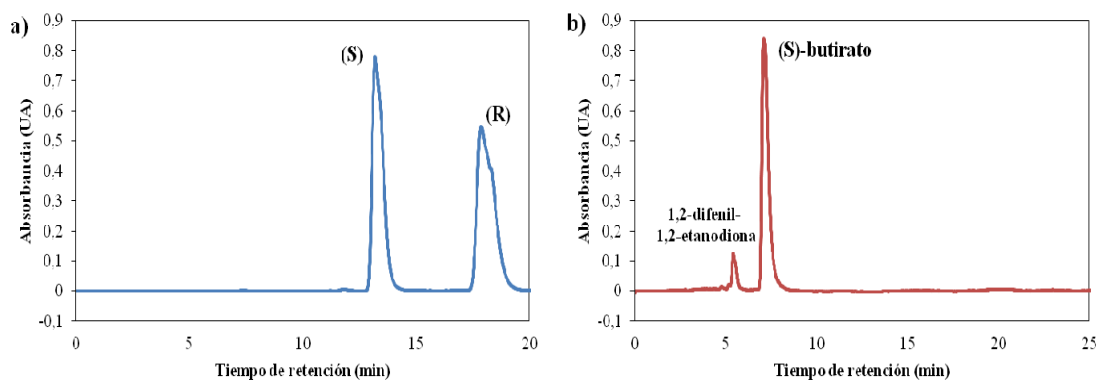
#### 5.5.2.2.2. Resolución cinética dinámica de (*R, S*)-1,2-difenil-2-hidroxi-etanona por combinación de lipasa de *Pseudomonas stutzeri* y el catalizador de Shvo.



**Esquema 73.** Resolución cinética dinámica de (*R, S*)-1,2-difenil-2-hidroxi-etanona (44) por combinación de lipasas y el catalizador de Shvo.

Se llevó a cabo la resolución cinética-dinámica de (*R, S*)-1,2-difenil-2-hidroxi-etanona (Esquema 73) por combinación de lipasa de *Pseudomonas stutzeri* inmovilizada sobre poli(GMA-*co*-HDDMA)-2 y el catalizador de Shvo siguiendo el procedimiento experimental descrito en el apartado 6.4.2.2.2. El resultado obtenido en esta resolución cinética dinámica a las 20 horas fue de una conversión del 95% y un exceso enantiomérico superior al 99%.

La evolución de las reacciones se llevó a cabo mediante el análisis de muestras tomadas a diferentes tiempos en HPLC. En la Figura 178 se pueden observar los cromatogramas obtenidos al inicio y al final del proceso de resolución cinética. En la Figura b), se puede ver el producto de reacción y el producto originado por la oxidación del reactivo inicial, la (*R, S*)-1,2-difenil-1,2-etanodiona.



**Figura 178.** Cromatogramas de la resolución cinética dinámica de (*R*, *S*)-1,2-difenil-2-hidroxietanona. a) Cromatograma del reactivo inicial. b) Cromatograma una vez concluido el proceso de resolución cinética dinámica.

El producto obtenido, (*S*)-butirato de 1,2-difenil-2-oxoetilo (**46**), se identificó por comparación, de su tiempo de retención y del poder óptico rotatorio del producto con resultados obtenidos por otros grupos de investigación,<sup>474, 476-479</sup> y por su espectro de RMN una vez aislado y purificado. La asignación de las señales del espectro de RMN-<sup>1</sup>H y del espectro de RMN-<sup>13</sup>C, aparecen en la Parte Experimental.

#### 5.5.2.2.1. Estudio comparativo de los resultados obtenidos en la DKR de (*R*, *S*)-1,2-difenil-2-hidroxietanona con los resultados publicados por otros grupos de investigación.

En la Tabla 138 aparecen reflejados los resultados obtenidos en la resolución cinética-dinámica de (*R*, *S*)-1,2-difenil-2-hidroxietanona por combinación de lipasa de *Pseudomonas stutzeri* inmovilizada sobre poli(GMA-*co*-HDDMA)-2 y el catalizador de Shvo. En este estudio comparativo hay que tener en cuenta que aunque se emplee la misma enzima, los diferentes lotes empleados de la lipasa TL<sup>®</sup> de *Pseudomonas stutzeri*, presentaron diferentes purezas y actividades enzimáticas.<sup>476</sup>

Como puede observarse en esta Tabla, los mejores resultados obtenidos en cuanto a productividad han sido obtenidos empleando la lipasa de *Ps. stutzeri* inmovilizada (Lip TL-SS) por adsorción sobre silicona modificada ( $2.6 \times 10^{-3}$  mmol/ mg enzima hora) seguido de el derivado inmovilizado poli(GMA-*co*-HDDMA)-2 ( $1.4 \times 10^{-3}$  mmol/ mg enzima hora). En cuanto al grado de conversión, el mejor resultado se ha obtenido en esta memoria de tesis con el derivado inmovilizado poli(BGMPMA-*co*-EGDMA)-8) con el 95% seguido de la lipasa de *Ps. stutzeri* inmovilizada (Lip TL-SS) por adsorción sobre silicona modificada con un 87%.

**Tabla 138.** Estudio comparativo de los resultados obtenidos en la DKR de (*R, S*)-1,2-difenil-2-hidroxicetona.

Nº	Enzima empleada	Conversión (%)	e.e. producto (%)	E	Productividad (mmol p. /mg enzima horas)
1	<i>Ps. stutzeri</i> poli(GMA-co-HDDMA)-2	95	>99	>200	$1.4 \times 10^{-3}$
2 <sup>476, 477</sup>	<i>Ps. stutzeri</i> Enzima libre	87	>99	>200	$2.2 \times 10^{-4}$
3 <sup>474, 476</sup>	<i>Ps. stutzeri</i> Lip TL-SS	87	>99	>200	$2.6 \times 10^{-3}$
4 <sup>478</sup>	<i>Ps. stutzeri</i> Enzima libre	85	>99	>200	$6.5 \times 10^{-4}$

1. Condiciones de reacción: 0.094 mmol de (*R, S*)-1,2-difenil-2-hidroxicetona (20 mg), 0.3 mmol de butirato de trifluoroetilo (46  $\mu$ l), 0.01 mmol del catalizador de Shvo (10 mg) y 1.5 mL de metil-tetrahidrofurano. T<sup>a</sup>: 50°C, 20 horas, 3.12 mg de enzima.

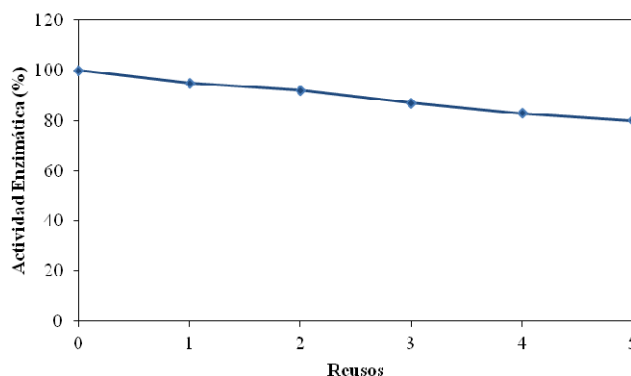
2<sup>476, 477</sup> Condiciones de reacción: 0.235 mmol de (*R, S*)-1,2-difenil-2-hidroxicetona, 1.32 mmol de butirato de trifluoroetilo, 0.05 mmol del catalizador de Shvo y 2.5 mL de THF. T<sup>a</sup>: 50°C, 55 horas, 17 mg de enzima.

3<sup>474, 476</sup> Condiciones de reacción: 0.14 mmol de (*R, S*)-1,2-difenil-2-hidroxicetona, 0.99 mmol de butirato de trifluoroetilo, 0.055 mmol del catalizador de Shvo y 1.5 mL THF. T<sup>a</sup>: 60°C, 20 horas, 2.30 mg de enzima.

4<sup>478</sup> Condiciones de reacción: 2.5 mmol de (*R, S*)-1,2-difenil-2-hidroxicetona, 7.5 mmol de butirato de trifluoroetilo, 0.0125 mmol del catalizador de Shvo y 10 mL metil-tetrahidrofurano. T<sup>a</sup>: 55°C. Se llevo a cabo en dos etapas: la primera, 24 horas con 51 mg de enzima; y la segunda, 24 horas tras añadir 17 mg de enzima.

#### 5.5.2.2.2. Reutilización de la lipasa de *Pseudomonas stutzeri* inmovilizada sobre poli(GMA-co-HDDMA)-2 en la resolución cinética dinámica de (*R, S*)-1,2-difenil-2-hidroxicetona.

El estudio de reutilización del derivado inmovilizado poli(GMA-co-HDDMA)-2 en la resolución cinética dinámica de (*R, S*)-1,2-difenil-2-hidroxicetona se llevó a cabo siguiendo el procedimiento experimental descrito en el apartado 6.4.2.2.1. Los resultados obtenidos en este estudio se presentan en la Figura 179.

**Figura 179.** Reutilización del derivado inmovilizado en la resolución cinética dinámica de (*R, S*)-1,2-difenil-2-hidroxicetona (44).

En esta Figura se puede observar, que después de 5 reusos el derivado inmovilizado retuvo un 80% de la actividad catalítica inicial, obteniéndose una productividad total de 0.15

mmol de producto/mg de enzima inmovilizada. Este dato es algo inferior a los resultados publicados por otro grupo de investigación respecto a la resolución cinética dinámica de (*R, S*)-1,2-difenil-2-hidroxi-etanona,<sup>474</sup> en los cuales se obtiene una productividad total de 0.19 mmol de producto/mg de enzima inmovilizada, tras tres reusos, reteniendo el 90% de la actividad catalítica inicial del derivado inmovilizado.

### 5.5.3. Aplicaciones industriales de los biocatalizadores.

Los derivados inmovilizados obtenidos en esta memoria podrían ser empleados eficientemente en procesos de producción industrial. Para ello se requeriría un proceso de optimización y escalado.

El escalado industrial, podría llevarse a cabo en reactores tipo tanque dotados de un sistema de agitación mecánica ó en reactores tipo columna.<sup>569</sup> En este proceso se tendrían que optimizar diversos factores, como son:

-Reactor tipo tanque: volumen del reactor, volumen del derivado inmovilizado respecto al volumen total del reactor, volumen del disolvente empleado, concentración de reactivos en el medio de reacción, mecanismo de agitación, velocidad de agitación, sistema de llenado y vaciado del reactor, tiempo de reacción, etc.

-Reactor tipo columna: dimensiones del reactor, empaquetamiento del biocatalizador, tiempo necesario de retención de los reactivos en el reactor, velocidad del flujo, presión en el reactor, etc.

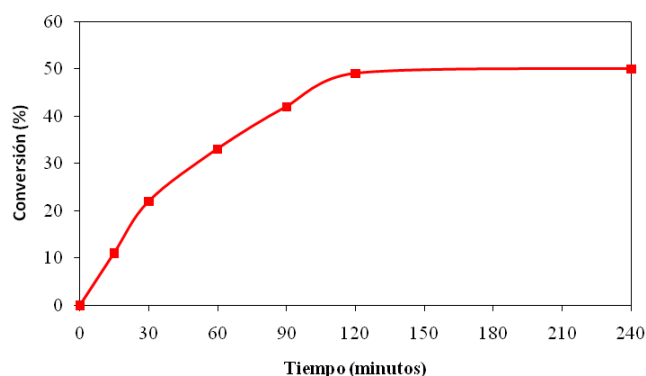
Con el objetivo de automatizar el empleo de los biocatalizadores obtenidos en esta memoria a nivel industrial, se realizaron unas pruebas de escalado de la resolución cinética de (*R,S*)-1,2-difenil-2-hidroxi-etanona empleando como biocatalizador la lipasa de *Pseudomonas stutzeri* inmovilizada en poli(GMA-co-HDDMA)-2, tanto en un reactor en tanque como en un reactor tipo columna. Para ello, se llevó a cabo un estudio comparativo realizando unas reacciones de resolución cinética siguiendo el procedimiento experimental descrito en el apartado 6.5.

La evolución de las reacciones se llevó a cabo mediante el análisis de muestras tomadas a diferentes tiempos en HPLC.

#### 5.5.3.1. Resolución cinética de (*R, S*)-1,2-difenil-2-hidroxi-etanona (44) empleando la lipasa de *Pseudomonas stutzeri* inmovilizada en poli(GMA-co-HDDMA)-2 en un reactor tipo tanque.

La evolución del proceso de resolución cinética de (*R, S*)-1,2-difenil-2-hidroxi-etanona en un reactor tipo tanque, se puede observar en la Figura 180. Como se puede ver en esta Figura, se alcanza una conversión del 49% a los 120 minutos con un exceso enantiomérico del producto

superior al 99%, obteniéndose una productividad de  $2.46 \times 10^{-3}$  mmol/ mg enzima hora, resultado muy similar al obtenido en el mismo proceso en una escala inferior (apartado 5.5.2.1.6.) que fue de  $2.5 \times 10^{-3}$  mmol/ mg enzima hora.



**Figura 180.** Proceso de resolución cinética de *(R, S)*-1,2-difenil-2-hidroxi-etanona empleando la lipasa de *Pseudomonas stutzeri* inmovilizada en poli(GMA-co-HDDMA)-2 en un reactor tipo tanque.

### 5.5.3.2. Resolución cinética de *(R, S)*-1,2-difenil-2-hidroxi-etanona (44) empleando la lipasa de *Pseudomonas stutzeri* inmovilizada en poli(GMA-co-HDDMA)-2 en un reactor tipo columna.

Este proceso se llevó a cabo en una columna de cromatografía (30x1cm), en la que se empaquetaron 3 g del derivado inmovilizado poli(GMA-co-HDDMA)-2 (46.8 mg de enzima,  $87 \text{Umg}^{-1}$ ) empleando como disolvente metil-tetrahidrofurano, obteniéndose una longitud de 21 centímetros de relleno. A continuación se cargó en la columna 10 mL de una disolución de 0.47 mmol de *(R, S)*-1,2-difenil-2-hidroxi-etanona (100 mg) y 1.5 mmol de butirato de vinilo (114  $\mu\text{l}$ ) en metil-tetrahidrofurano. Posteriormente se aplicó presión a la columna con ayuda de un compresor (típico de los empleados en columna cromatográficas). Una vez que se fijaron los 10 mL de mezcla de reacción, se añadió a la columna 30 mL de metil-tetrahidrofurano y se continuó con el proceso de resolución.

El seguimiento del proceso de resolución cinética se realizó recogiendo fracciones de 1 mL que fueron analizadas por HPLC, y se obtuvo un tiempo de retención, de la mezcla de reacción, en la columna de 60 minutos, con una conversión del 50% con un exceso enantiomérico del producto superior al 99%. Se evaluó como tiempo final de reacción 90 minutos, que fue el tiempo en el que dejó de aparecer producto y reactivo remanente en el eluyente de reacción. En este proceso de resolución cinética se obtiene una productividad de  $3.3 \times 10^{-3}$  mmol/ mg enzima hora, lo que indica que la productividad del proceso empleando un reactor tipo columna es significativamente superior a la productividad obtenida empleando un reactor tipo tanque ( $2.46 \times 10^{-3}$  mmol/ mg enzima hora).

Los resultados obtenidos en el proceso de resolución cinética, tanto en reactor en tanque como en reactor tipo columna, son muy esperanzadores. La productividad del proceso de resolución en un reactor tipo columna es superior a la obtenida en un reactor tipo tanque, pero este dato no es concluyente, ya que se debería hacer una evaluación completa de costes y eficiencia del proceso a escala de planta piloto y posteriormente a escala industrial.

Hasta el momento, sólo se ha publicado un estudio de escalado de este tipo empleando (*R, S*)-1,2-difenil-2-hidroxietanona como sustrato.<sup>477</sup> En dicho estudio se resuelven 100 mg (*R, S*)-1,2-difenil-2-hidroxietanona empleando la enzima libre y THF como disolvente. Dicho proceso se llevo a cabo empleando diferentes temperaturas y diferentes tiempos de reacción ( $T^a$  ambiente, 24 horas; 37°C, 24 horas; 50°C, 4 horas), obteniéndose productividades de  $2.6 \times 10^{-4}$ ,  $2.83 \times 10^{-4}$  y  $1.73 \times 10^{-3}$  mmol/mg enzima hora respectivamente. Mientras que en esta memoria de tesis empleando un reactor tipo columna se ha obtenido una productividad de  $3.3 \times 10^{-3}$  mmol/mg enzima hora.





## Capítulo VI

# *Parte experimental*



## 6. PARTE EXPERIMENTAL

### 6.1. Materiales y métodos.

#### 6.1.1. Reactivos químicos.

Todos los reactivos químicos empleados, así como los productos, se obtuvieron de diferentes casas comerciales: Bio-Rad, Fluka, Scharlau, Merck, SDS y Sigma-Aldrich. El estabilizante del divinil benceno (DVB) fue eliminado con una disolución 0.1 M de NaOH.

Las diferentes (*R, S*)-1,2-diaril-2-hidroxicetonas fueron proporcionadas por la Dra. Pilar Hoyos del Grupo de Investigación de Biotransformaciones del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica, de la Facultad de Farmacia, de la Universidad Complutense de Madrid.

El catalizador de Shvo [1-hidroxitetrafenilciclopentadienil (tetrafenil-2,4-ciclopentadien-1-ona)- $\mu$ -hidrotetracarbonil-dirutenio (II)], fue adquirido en Strem Chemicals.

#### 6.1.2. Disolventes verdes.

Los disolventes de fuentes renovables derivados de glicerol:<sup>540</sup> 1,3-dimetoxipropan-2-ol (GC4), 2-butoxi-3-metoxipropan-2-ol (GC5), 1-terc-butoxi-3-metoxipropan-2-ol (GC6), 1-isopropoxi-3-(2,2,2-trifluoroetoxi)propan-2-ol (GC7), 1,3-bis(2,2,2-trifluoroetoxi)propan-2-ol (GC8), 2-metoxi-1,3-bis(2,2,2-trifluoroetoxi)propano (GC9), 1-butoxi-3-isobutoxi-2-ol (GC10), 1,3-dibutoxi-2-ol (GC11), 1-(3-butoxi-2-metoxipropoxi)butano (GC12), 1,3-bis(2,2,3,3,3-pentafluoropropoxi)propan-2-ol (GC13) y 1,3-bis(2,2,3,3,4,4,4-heptafluorobutoxi)propan-2-ol (GC14), fueron proporcionados por el Dr. José I. García del Instituto de Ciencias Materiales de Aragón perteneciente al CSIC, Zaragoza.

Los derivados cíclicos del glicerol: 1,3-dioxan-5-ol (G1), 5-hidroxi-1,3-dioxan-2-ona, (G2) y 2,2-dimetil-(1,3-dioxolan-1-il)metanol (G3) y derivados de dimetilamida: 2-hidroxi-*N,N*-dimetilpropanamida (DMA1), *N,N*-dimetilbenzamida (DMA2), *N,N*-dimetilhexanamida (DMA3), *N,N*-dimetiloctanamida (DMA4), *N,N*-dimetildecanamida (DMA5) y *N,N*-dimetildodecanamida (DMA6), fueron proporcionados por la empresa COGNIS IP Management GMBH (Alemania)

Los líquidos iónicos: trioctilmetilamonio hexafluorofosfato bistriflimida [Troma][NTf<sub>2</sub>], CPMA alquil pentaetoxi metil amonio metil sulfato [CPMA][MeSO<sub>4</sub>], octil metil imidazolio hexafluorofosfato [Omim][PF<sub>6</sub>], fueron proporcionados por Dr. Pedro Lozano del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular e Inmunología de la Facultad de Química de la Universidad de Murcia. Mientras que el butil metil imidazolio hexafluorofosfato [Bmim][PF<sub>6</sub>] y el Etil metil imidazolio tetrafluoroborato [Emim][BF<sub>4</sub>], butil metil imidazolio tris (pentafluoroetil) trifluorofosfato [Bmim][FAP], fueron comprados a Sigma-Aldrich.

### 6.1.3. Enzimas.

- $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans*, BIOLACTA N5 (Daiwa Kasei, Osaka, Japón).
- $\beta$ -galactosidasa grado VII de *Escherichia coli* (Sigma).
- $\beta$ -galactosidasa recombinante de *Bacillus circulans*  $\beta$ -gal-3 ATCC 31382 (producida por el Licenciado Carlos Bayón Sánchez del Grupo de Investigación de Biotransformaciones del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica, de la Facultad de Farmacia, de la Universidad Complutense de Madrid).
- $\beta$ -galactosidasa de *Thermus thermophilus* TTP0042 (proporcionada por el Dr. Manuel Sandoval del Grupo de Investigación de Biotransformaciones del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica, de la Facultad de Farmacia, de la Universidad Complutense de Madrid).
- Amano lipasa AK de *Pseudomonas fluorescens* (Sigma).
- Lipasa PS de *Pseudomonas cepacia* (Sigma).
- Lipasa de *Pseudomonas stutzeri*, Lipasa TL<sup>®</sup> (Meito & Sangyo).

### 6.1.4. Técnicas experimentales.

#### 6.1.4.1. Cromatografía.

El seguimiento de las reacciones se realizó por cromatografía en capa fina empleando cromatofolios de gel de sílice de 0.2 mm de espesor (Merck-60 230-400 mesh).

Las cromatografías en columna se realizaron con gel de sílice (Merck, 230-400 mesh ASTM). El eluyente se indica en cada caso, presentándose las proporciones relativas de disolventes en volumen/volumen.

Las cromatografías en columna para la purificación de glicósidos se llevaron a cabo empleando como fase estacionaria carbón activo (Aldrich) y Celite 535 Coarse (Fluka) en porciones 1/1 (v/v).

#### 6.1.4.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

El seguimiento de las reacciones enzimáticas de transglicosidación se realizó mediante HPLC (cromatografía líquida de alta resolución), empleando para ello un cromatógrafo Jasco 2000 equipado con una columna NH<sub>2</sub>P50-4E de grupos aminos (Asahipak, Japón) eluido a 0,8 mL/min, con una fase móvil de 80% acetonitrilo y 20% de agua. Se utilizaron detectores de luz ultravioleta (UV) y de dicroísmo circular (DC) fijados a 317 nm (porque a esa longitud de onda el grupo *p*-nitrofenil sin ionizar son más sensibles a ser detectados) y conectados en serie con un detector de dispersión de la luz por evaporación (“*evaporative light scattering detector*”, ELSD, temperatura del tubo de deriva [DT]: 60°C y de la cámara de spray [SC]: 54°C).

El seguimiento de las resoluciones cinéticas y resoluciones cinéticas dinámicas se llevó a cabo empleando un HPLC TSP Termo Separation Products dotado de un sistema “diodo array”, Spectromonitor 5000 y una columna quiral Chiralcel OD y Chiralcel OD-H (carbamato de celulosa, 25 cm x 0.46 cm). Se empleó una fase móvil de *n*-hexano: 2-propanol (90:10) y un flujo 0.8 mL/min.

#### 6.1.4.3. Cromatografía en columnas de Carbón-Celite.

La purificación de disacáridos obtenidos en reacciones enzimáticas de transglucosidación se realizó por medio de columnas compuestas por 50% m/m de carbón activado y 50% m/m de celite, en columnas de 2x50 cm, con una altura de columna de aproximadamente 20 cm. Las columnas se lavan como mínimo con 3 volúmenes de agua respecto al volumen de soporte, y se eluyen con un mínimo de 3 volúmenes equivalentes al de la columna, utilizando cada una de las siguientes fases móviles, en orden respectivo:

- 100% agua milliQ,
- 5% de etanol absoluto en agua milliQ
- 15% de etanol absoluto en agua milliQ.

Los disacáridos se recogen en las fracciones de la última elución, correspondiente al 15% de etanol (analizadas inicialmente por CCF). Posteriormente se analiza la pureza por HPLC-ELSD y se determinó su estructura por espectroscopia de resonancia magnética nuclear.

#### 6.1.4.4. Medida del poder óptico rotatorio de los productos.

Se llevó a cabo empleando un polarímetro Perkin-Elmer 240 (20 °C, lámpara de Na, línea  $D = 589 \text{ nm}$ ) y unas disoluciones de los productos ( $2 \times 10^{-3} \text{ g/mL}$  en cloroformo), obteniéndose su medida de rotación óptica ( $\alpha$ ). El valor de rotación específica se calculó mediante la ecuación  $[\alpha] = \alpha / (l \cdot c)$ , donde:  $l$  = longitud de la cubeta (1 cm) y  $c$  = concentración de la muestra (g/mL).

#### 6.1.4.5. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Los espectros de resonancia magnética nuclear se realizaron en un equipo Bruker AC-300, excepto en el caso de el *N*-acetil-lactosamina que se empleó un equipo Bruker AC-700. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en ppm, relativos al disolvente empleado ( $\text{CDCl}_3$  ó  $\text{D}_2\text{O}$ ).

#### 6.1.4.6. Adsorción-desorción de nitrógeno.

Los valores de superficie específica y tamaño de poro fueron determinados por adsorción de nitrógeno a 77° K empleando equipo TriStar (Micromeritics, U.S.). Las muestras fueron des

gasificadas a 120° C durante 18 horas. Los valores de superficie específica fueron calculados usando la ecuación BET <sup>506</sup> con un intervalo de presión de nitrógeno entre 0.05-0.35. Los valores de tamaño de poro fueron obtenidos empleando isotermas de adsorción de nitrógeno de acuerdo con el método BET <sup>506</sup> y BJH <sup>507, 508</sup> y las distribuciones de poro fueron obtenidas empleando isotermas de adsorción de acuerdo con el método BJH. <sup>507, 508</sup>

#### **6.1.4.7. Determinación del grado de epoxidación de los polímeros.**

En matraces de 25 mL se pesan 100 mg de cada polímero y se añaden 10 mL de una solución de bromuro de tetraetil amonio 0.1 M en ácido acético y unas 4 gotas de una solución al 20 % de cristal violeta en ácido acético. A continuación se añade gota a gota una solución de ácido perclórico 0.1 M hasta que se produce un cambio de color de violeta a verde. <sup>570-572</sup> Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se obtuvo el grado de epoxidación como media de los tres valores.

#### **6.1.4.8. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier. ATR/FT-IR.**

Los espectros ATR/FT-IR se realizaron empleando el equipo Perkin-Elmer modelo 681. Los valores de  $\nu$  de los espectros aparecen expresados en  $\text{cm}^{-1}$ .

#### **6.1.4.9. Caracterización térmica.**

Los análisis termogravimétrico (TGA) se realizaron empleando el equipo Q-500 de TA instruments, con una cantidad de muestra entre 4-6 mg, a una velocidad de calentamiento de 5° C/min bajo un flujo de nitrógeno líquido de 20mL/min.

#### **6.1.4.10. Espectroscopia ultravioleta/visible (UV/vis).**

Las medidas se realizaron en el espectrofotómetro UV-2401 PC (Shimadzu).

#### **6.1.4.11. Liofilización.**

Las liofilizaciones se realizaron en un liofilizador “Labconco, Lyph-Lock 12” (Hucha-Erlóss).

#### **6.1.4.12. Reacciones en serie.**

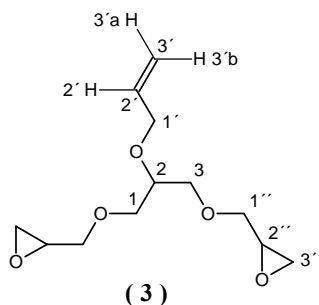
Las reacciones de síntesis de disacáridos se realizaron en un reactor en serie RR98072 de la marca Radleys, equipado con refrigeración por agua recirculante, agitación magnética controlada y control de temperatura. Con este sistema todas las reacciones conservan la misma agitación y temperatura.

## 6.2. Procedimiento de síntesis de productos.

### 6.2.1. Síntesis de monómeros.

#### 6.2.1.1. Síntesis de monómeros alquioxiranos.

##### 6.2.1.1.1. Síntesis y caracterización de 2-alil-1,3-diglicidil glicerol éter (3).



En un matraz de dos bocas de 50 mL, se introduce diglicidil glicerol (2) (2 g, 9.8 mmol) y 20 mL de THF. El sistema se sella con tapones de teflón, se purga con una corriente de argón y se coloca en un baño de hielo. Se adiciona NaH (0.26 g, 10.8 mmol) en porciones. Transcurridos 15 minutos, se adiciona bromuro de alilo (4.2 mL, 49 mmol) y TBAI (0.1g). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 18 horas y transcurrido ese tiempo se añade 30 mL de agua y se extrae con 3 x 75 mL de éter dietílico. La fase orgánica se seca sobre MgSO<sub>4</sub> y se elimina el disolvente a presión reducida, obteniendo un aceite incoloro que se purifica por cromatografía en columna empleando como eluyente hexano/acetato de etilo (2/1). Se obtiene 1.3 g (60%) del compuesto 3 como aceite transparente.

**RMN-<sup>1</sup>H** 500 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 2.56 (m, 2H, H-3''a), 2.74 (dd, J<sub>3''b, 3''a</sub>: 5.0, J<sub>3''b, 2''</sub>: 4.3 Hz, 2H, H-3''b), 3.10 (m, 2H, H-2''), 3.38 (m, 2H, H-1''a), 3.50-3.60 (m, 4H, H-1 y H-3), 3.64 (m, 1H, H-2), 3.74 (m, 2H, H-1''b), 4.10 (m, 2H, H-1'), 5.12 (ddt, J<sub>3'a, 2'</sub>: 10.3, J<sub>3'a, 3'b</sub>: 3.0, J<sub>3'a, 1'</sub>: 1.5 Hz, 1H, H-3'a), 5.24 (ddt, J<sub>3'b, 2'</sub>: 17.2, J<sub>3'b, 3'a</sub>: 3.0, J<sub>3'b, 1'</sub>: 1.0 Hz, 1H, H-3'b), 5.87 (ddt, J<sub>2', 3'b</sub>: 17.2, J<sub>2', 3'a</sub>: 10.3, J<sub>2', 1'</sub>: 2.8 Hz, 1H, H-2').

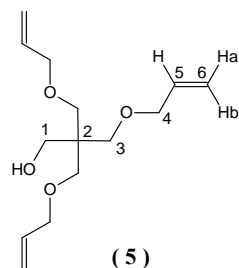
**RMN-<sup>13</sup>C**, 75.5 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 44.03 (C-3''), 50.66 (C-2''), 71.16 (C-1, C-3, C-1'), 71.99 (C-1''), 76.87 (C-2), 116.81 (C-3'), 134.95 (C-2').

**MS:** - Teórica: 244.28

- Experimental (Electrospray+): 267.12 (M+Na).

### 6.2.1.1.2. Síntesis de alil triglicidil pentaeritritol éter (7).

#### a. Síntesis de trialil pentaeritritol éter (5).

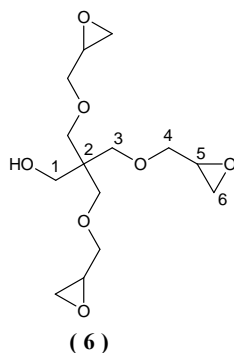


En un matraz de dos bocas de 50 mL, provisto de refrigerante y embudo de adición, se introduce pentaeritritol (4) (1.0 g, 73.5 mmol) y se añaden 15 mL de dioxano. Se agita durante unos minutos y se añade una disolución de hidróxido sódico (1.17 g, 293 mmol) en 5 mL de agua. La mezcla de reacción se agita durante 30 minutos a una temperatura de 45°C. A continuación, se añade, gota a gota, sobre la mezcla de reacción, bromuro de alilo (2.53 mL, 293 mmol) y se mantiene durante 20 horas bajo agitación, a una temperatura de 45-47°C. Posteriormente, se filtra la mezcla de reacción y se elimina el disolvente a presión reducida. El producto de reacción se purifica por cromatografía en columna utilizando como eluyente hexano/acetato de etilo (1/1). Se obtiene 0.6 g (42%) del compuesto 5 como aceite transparente.

**RMN-<sup>1</sup>H**, 300 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 2.79 (s, 1H, OH), 3.49 (s, 6H, H-3), 3.73 (s, 2H, H-1), 3.95 (ddd, J<sub>4, 5</sub>: 5.5, J<sub>4, 6a</sub>: 1.4, J<sub>4, 6b</sub>: 1.4 Hz, 6H, H-4), 5.16 (ddd, J<sub>6a, 5</sub>: 10.3, J<sub>6a, 6b</sub>: 2.8, J<sub>6a, 4</sub>: 1.4 Hz, 3H, H-6a), 5.24 (ddd, J<sub>6b, 5</sub>: 17.2, J<sub>6b, 6a</sub>: 2.8, J<sub>6b, 4</sub>: 1.4 Hz, 3H, H-6b), 5.86 (ddt, J<sub>5, 6b</sub>: 17.2, J<sub>5, 6a</sub>: 10.3, J<sub>5, 4</sub>: 5.5 Hz, 3H, H-5).

**RMN-<sup>13</sup>C**, 75.5 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 44.96 (C-2), 66.09 (C-1), 70.91 (C-3), 72.44 (C-4), 116.53 (C-6), 134.77 (C-5).

#### b. Síntesis de triglicidil pentaeritritol éter (6).



En un matraz de 100 mL se introduce trialil pentaeritritol (5) (1.0 g, 4.1 mmol) y se añade 50 mL de diclorometano. Se agita durante unos minutos y se introduce el matraz en un baño de hielo. A continuación se añade una disolución de MCPBA (2.8 g, 16.4 mmol) en 20 mL

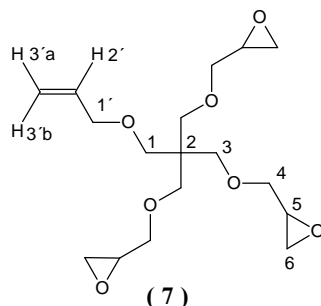


de diclorometano. Se mantiene la reacción a 0° C durante 1 hora, y 18 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se lava sucesivamente con dos porciones de 15 mL de una disolución 1M de NaOH, dos porciones de 15 mL de agua y 15 mL de Brine. La fase orgánica se seca sobre sulfato magnésico y se elimina el disolvente a presión reducida, obteniéndose 1.2 g (95%) del compuesto **6** en forma de aceite incoloro que no hace falta purificar.

**RMN-<sup>1</sup>H**, 300 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 2.55 (dd, J<sub>6a,6b</sub>: 5.3, J<sub>6a,5</sub>: 2.5 Hz, 3H, H-6a), 2.73 (dd, J<sub>6b,6a</sub>: 5.3, J<sub>6b,5</sub>: 4.2 Hz, 3H, H-6b), 3.07 (m, 3H, H-5), 3.32 (dd, J<sub>4a,4b</sub>: 11.6, J<sub>4a,5</sub>: 5.7 Hz, 3H, H-4a), 3.47 (m, 6H, H-3), 3.63 (s, 2H, H-1), 3.70 (dd, J<sub>4b,4a</sub>: 11.6, J<sub>4b,5</sub>: 3.0 Hz, 3H, H-4b).

**RMN-<sup>13</sup>C**, 75.5 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 44.10 (C-6), 45.36 (C-2), 50.73 (C-5), 64.91 (C-1), 71.4 (C-3), 77.13 (C-4).

### c. Síntesis de alil triglicidil pentaeritritol éter (**7**).



En un matraz de dos bocas de 50 mL, se introduce triglicidil pentaeritritol (**6**) (1.0 g, 3.4 mmol) y 20 mL de THF. El sistema se sella con tapones de teflón, se purga con una corriente de argón y se coloca en un baño de hielo. Se adiciona NaH (0.084 g, 3.4 mmol) en porciones. Transcurridos 15 minutos se adiciona bromuro de alilo (0.42 mL, 4.9 mmol) y TBAI (0.1 g). La mezcla de reacción de agita a temperatura ambiente durante 18 horas, y transcurrido ese tiempo se añaden 30 mL de agua y se extrae con 3 x 75 mL de éter etílico. La fase orgánica se seca sobre MgSO<sub>4</sub> y se elimina el disolvente a presión reducida, obteniendo 1.1 g (97%) del compuesto **7** como un aceite transparente que no necesita ser purificado.

**RMN-<sup>1</sup>H**, 300 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 2.57 (dd, J<sub>6a,6b</sub>: 5.3, J<sub>6a,5</sub>: 2.5 Hz, 3H, H-6a), 2.75 (dd, J<sub>6b,6a</sub>: 5.3, J<sub>6b,5</sub>: 4.2 Hz, 3H, H-6b), 3.09 (m, 3H, H-5), 3.36 (dd, J<sub>4a,4b</sub>: 11.7, J<sub>4a,5</sub>: 5.7 Hz, 3H, H-4a), 3.41 (s, 2H, H-1), 3.46 (d, J<sub>3a,3b</sub>: 9.2 Hz, 3H, H-3a), 3.50 (d, J<sub>3b,3a</sub>: 9.2 Hz, 3H, H-3b), 3.67 (dd, J<sub>4b,4a</sub>: 11.7, J<sub>4b,5</sub>: 3.0 Hz, 3H, H-4b), 3.93 (ddd, J<sub>1',2'</sub>: 5.4, J<sub>1',3'a</sub>: 1.4, J<sub>1',3'b</sub>: 1.4 Hz, 2H, H-1'), 5.12 (ddt, J<sub>3'a,2'</sub>: 10.5, J<sub>3'a,3'b</sub>: 3.0, J<sub>3'a,1'</sub>: 1.4 Hz, 1H, H-3'a), 5.23 (ddt, J<sub>3'b,2'</sub>: 17.2, J<sub>3'b,3'a</sub>: 3.0, J<sub>3'b,1'</sub>: 1.4 Hz, 1H, H-3'b), 5.86 (ddt, J<sub>2',3'b</sub>: 17.2, J<sub>2',3'a</sub>: 10.5, J<sub>2',1'</sub>: 5.4 Hz, 1H, H-2').

**RMN-<sup>13</sup>C**, 75.5 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 44.19 (C-6), 45.65 (C-2), 50.81 (C-5), 68.85 (C-1), 70.11 (C-3), 72.01 (C-4), 72.23 (C-1'), 116.14 (C-3'), 135.12 (C-2').

La asignación de las señales concuerda con la asignación detallada por otro grupo de investigación.<sup>483</sup>

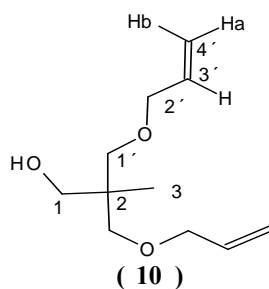
**MS:** - Teórica: 344.4

- Experimental (Electrospray+): 345.19 (M+H), 367.17 (M+Na).

### 6.2.1.2. Síntesis de monómeros metacriloxiranos.

#### 4.2.1.3.1. Síntesis de {{2, 2bis [(glicidiloxi) metil]} propil} metacrilato (12).

##### a. Síntesis de 2, 2-bis [(aliloxi) metil] propan-1-ol (10).

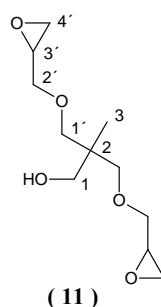


En un matraz de dos bocas de 50 mL provisto de refrigerante, se introduce 1, 1, 1-tris (hidroximetil)etano (**9**) (1.0 g, 8.3 mmol) y 15 mL de dioxano. Se agita durante unos minutos y se añade una disolución de hidróxido sódico (0.83 g, 20.8 mmol) en 5mL de agua. La mezcla se agita durante 30 minutos a 45°C. A continuación, se añade, gota a gota, sobre la mezcla de reacción bromuro de alilo (1.6 mL, 16.4 mmol) y se mantiene durante 20 horas bajo agitación a una temperatura de 45-47° C. Posteriormente, se filtra la mezcla de reacción y se elimina el disolvente a presión reducida. El producto de reacción se purifica por cromatografía en columna utilizando como eluyente hexano/acetato de etilo (1/1,5). Se obtiene 0.7 g (52%) del compuesto **10** en forma de un aceite amarillento.

**RMN-<sup>1</sup>H** 300 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 0.88 (s, 3H, H-3), 2.87 (t,  $J_{\text{HO},1}$ : 5.9 Hz, 1H, OH), 3.43 (d,  $J_{1'a,1'b}$ : 9.2 Hz, 2H, H-1'a), 3.47 (d,  $J_{1'b,1'a}$ : 9.2 Hz, 2H, H-1'b), 3.59 (d,  $J_{1,\text{OH}}$ : 5.9 Hz, 2H, H-1), 3.96 (d,  $J_{2',3'}$ : 4.4 Hz, 4H, H-2'), 5.18 (d,  $J_{4'a,3'}$ : 10.3 Hz, 2H, H-4'a), 5.26 (d,  $J_{4'b,3'}$ : 17.2 Hz, 2H, H-4'b), 5.89 (dd,  $J_{3',4'b}$ : 17.2,  $J_{3',4'a}$ : 10.3 Hz, 2H, H-3').

**RMN-<sup>13</sup>C** 75.5 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 17.57 (C-3), 40.51 (C-2), 69.41 (C-1), 72.42 (C1'), 74.80 (C-2'), 116.71 (C-4'), 134.68 (C-3').

**b. Síntesis de 2,2-bis [(glicidiloxi) metil] propan-1-ol (11).**

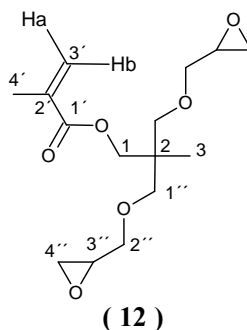


En un matraz de 100 mL se añade 2,2-bis [(aliloxi) metil] propan-1-ol (**10**) (1.0 g, 5 mmol) y 50 mL de diclorometano. Se agita durante unos minutos y se introduce el matraz en un baño de hielo. A continuación se añade una disolución de MCPBA (3.7 g, 15 mmol) en 20 mL de diclorometano. Se mantiene la reacción a 0° C durante 1 hora, y 18 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se lava sucesivamente con 2 x 15 mL de una disolución 1M de NaOH, 2 x de 15 mL de agua y 15 mL de Brine. La fase orgánica se seca sobre sulfato magnésico y se elimina el disolvente a presión reducida, obteniéndose 1.3 g (95%) del compuesto **11** como un aceite incoloro que no hace falta purificar.

**RMN-<sup>1</sup>H**, 300 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 0.87 (s, 3H, H-3), 2.61 (dd, J<sub>4'a, 4'b</sub>: 5.2, J<sub>4'a, 3'</sub>: 2.8 Hz, 2H, H-4'a), 2.79 (dd, J<sub>4'b, 4'a</sub>: 5.2, J<sub>4'b, 3'</sub>: 5.0 Hz, 2H, H-4'b), 3.13 (dddd, J<sub>3', 2'a</sub>: 5.5, J<sub>3', 4'b</sub>: 5.2, J<sub>3', 4'b</sub>: 3.0, J<sub>3', 4'a</sub>: 2.8 Hz, 2H, H-3'), 3.39 (dd, J<sub>2'a, 2'b</sub>: 11.5, J<sub>2'a, 3'</sub>: 5.5 Hz, 2H, H-2'a), 3.47 (d, J<sub>1'a, 1'b</sub>: 9.3 Hz, 1H, H-1'a), 3.51 (d, J<sub>1'b, 1'a</sub>: 9.3 Hz, 1H, H-1'b), 3.56 (s, 2H, H-1), 3.75 (dd, J<sub>2'b, 2'a</sub>: 11.5, J<sub>2'b, 3'</sub>: 3.0 Hz, 2H, H-2'b).

**RMN-<sup>13</sup>C**, 75.5 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 17.38 (C-3), 40.88 (C-2), 44.13 (C-4'), 50.83 (C-3'), 68.63 (C-1), 71.85 (C-1'), 72.10 (C-2').

**c. Síntesis de {{2, 2bis [(glicidiloxi) metil]} propil} metacrilato (12).**



En un matraz de 250 mL, se añade 2,2-bis [(glicidiloxi) metil] propan-1-ol (**11**) (3.0 g, 13 mmol) y 50 mL de tolueno. El sistema se sella con un septum de teflón, se purga con una corriente de argón y se coloca en un baño de hielo. Se adiciona gota a gota cloruro de

metacrililoilo (1.5 mL, 16 mmol) y trietil amina (4.5 mL, 32 mmol). Transcurridos 15 minutos se quita el baño de hielo y la mezcla de reacción se calienta a 100°C durante 3 horas. A continuación, se deja enfriar a temperatura ambiente y se lava la mezcla de reacción con 3 x de 50 mL de brine y con 3 x de 50 mL de una disolución saturada de bicarbonato sódico. La fase orgánica se seca sobre MgSO<sub>4</sub> y se elimina el disolvente a presión reducida, obteniendo un aceite amarillento. El producto de reacción se purifica por cromatografía en columna empleando como eluyente hexano/acetato de etilo (1/1). Se obtiene 3.3 g (85%) del compuesto **12** como aceite incoloro.

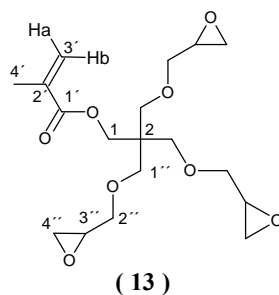
**RMN-<sup>1</sup>H**, 300 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 0.99 (s, 3H, H-3), 1.93 (s, 3H, H-4'), 2.57 (dd, J<sub>4''a, 4''b</sub>: 5.0, J<sub>4''a, 3''</sub>: 2.7 Hz, 2H, H-4''a), 2.76 (dd, J<sub>4''b, 4''a</sub>: 5.0, J<sub>4''b, 3''</sub>: 4.8 Hz, 2H, H-4''b), 3.09 (m, 2H, H-3''), 3.35 (dd, J<sub>2'a, 2'b</sub>: 11.6, J<sub>2'a, 3''</sub>: 5.6 Hz, 2H, H-2''a), 3.37 (d, J<sub>1''a, 1''b</sub>: 9.0 Hz, 2H, H-1''a), 3.42 (d, J<sub>1''b, 1''a</sub>: 9.0 Hz, 2H, H-1''b), 3.69 (dd, J<sub>2''b, 2''a</sub>: 11.6, J<sub>2''b, 3''</sub>: 2.8 Hz 2H, H-2''b), 4.07 (s, 2H, H-1), 5.54 (s ancho, 1H, H-3'a), 6.02 (s ancho, 1H, H-3'b).

**RMN-<sup>13</sup>C**, 75.5 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 17.24 (C-3), 18.33 (C-4'), 40.35 (C-2), 44.06 (C-4''), 50.85 (C-3''), 66.87 (C-1), 72.05 (C-2''), 73.65 (C-1''), 125.30 (C-3'), 136.40 (C-2'), 167.20 (C-1').

**MS:** - Teórica: 300.35

- Experimental (Electrospray+): 301.16 (M+H), 323.14 (M+Na).

#### 6.2.1.2.2. Síntesis de triglicidil pentaeritritil metacrilato (**13**).



En un matraz de 250 mL, se añade triglicidil pentaeritritol (**6**) (2.6 g, 9 mmol) y 50 mL de tolueno. El sistema se sella con un septum de teflón, se purga con una corriente de argón y se coloca en un baño de hielo. Se adiciona, gota a gota, cloruro de metacrililoilo (1.1 mL, 11 mmol) y trietil amina (2.5 mL, 18 mmol). Transcurridos 15 minutos, se quita el baño de hielo y la mezcla de reacción se calienta a 100°C durante 3 horas. A continuación, se deja enfriar a temperatura ambiente, y se lava la mezcla de reacción con 3 x 50 mL de brine y con 3 x 50 mL de una disolución saturada de bicarbonato sódico. La fase orgánica se seca sobre MgSO<sub>4</sub> y se elimina el disolvente a presión reducida, obteniendo un aceite amarillento. El producto de

reacción se purifica por cromatografía en columna empleando como eluyente hexano/acetato de etilo (1:4). Se obtiene 2.98 g (89%) del compuesto **13** como un aceite amarillento.

**RMN-<sup>1</sup>H**, 300 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 1.93 (s, 3H, H-4'), 2.55 (dd, J<sub>4''a, 4''b</sub>: 5.0, J<sub>4''a, 3''</sub>: 2.7 Hz, 3H, H-4''a), 2.75 (dd, J<sub>4''b, 4''a</sub>: 5.0, J<sub>4''b, 3''</sub>: 4.8 Hz, 3H, H-4''b), 3.08 (dddd, J<sub>3'', 2''a</sub>: 5.8, J<sub>3'', 4''b</sub>: 4.8, J<sub>3'', 2''b</sub>: 2.5, J<sub>3'', 4''a</sub>: 2.7 Hz, 3H, H-3''), 3.34 (ddd, J<sub>2''a, 2''b</sub>: 11.8, J<sub>2''a, 3''</sub>: 5.8, J<sub>2''a, 1''a</sub>: 2.5 Hz, 3H, H-2''a), 3.48 (ddd, J<sub>1''a, 1''b</sub>: 9.4, J<sub>1''a, 2''a</sub>: 2.5, J<sub>1''a, 2''b</sub>: 2.5 Hz, 3H, H-1''a), 3.54 (ddd, J<sub>1''b, 1''a</sub>: 9.4, J<sub>1''b, 2''a</sub>: 1.5, J<sub>1''b, 2''b</sub>: 1.5 Hz, 3H, H-1''b), 3.68 (ddd, J<sub>2''b, 2''a</sub>: 11.8, J<sub>2''b, 3''</sub>: 2.5, J<sub>2''b, 1''b</sub>: 1.5 Hz, 3H, H-2''b), 4.19 (s, 2H, H-1), 5.53 (s ancho, 1H, H-3'a), 6.07 (s ancho, 1H, H-3'b).

**RMN-<sup>13</sup>C**, 75.5 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 18.32 (C-4'), 44.05 (C-4''), 44.86 (C-2), 50.73 (C-3''), 63.67 (C-1), 69.93 (C-1''), 72.08 (C-2''), 125.32 (C-3'), 136.37 (C-2'), 167.01 (C-1').

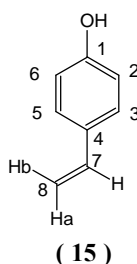
**MS**: - Teórica: 372.41

- Experimental (Electrospray+): 373.19 (M+H), 395.17 (M+Na).

### 6.2.1.3. Síntesis de monómeros ariloxiranos.

#### 6.2.1.3.1. Síntesis de *p*-glicidil estireno (**16**).

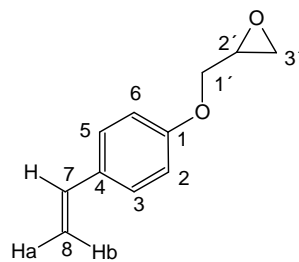
##### a. Síntesis de *p*-hidroxi estireno (**15**).



En un matraz de 50 mL se introduce *p*-acetoxi estireno (**14**) (1.0 g, 6.2 mmol) y se añaden 15 mL de metanol. A continuación se añade, bajo agitación, 0.01 g de metóxido sódico. Transcurridas 16 horas se elimina el disolvente a vacío y el crudo de reacción se disuelve con 20 mL éter etílico, se lava sucesivamente con 10 mL de una disolución 2% de HCl, 10 mL de agua y 10 mL de brine. La fase orgánica se seca sobre sulfato magnésico y se elimina el disolvente en el rota vapor. Se obtiene 0.73 g (98%) del compuesto **15** como un sólido blanco puro que no necesita purificación.

**RMN-<sup>1</sup>H**, 300 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 4.76 (s, 1H, OH), 5.18 (d, J<sub>8a, 7</sub>: 10.9 Hz, 1H, H-8a), 5.64 (d, J<sub>8b, 7</sub>: 17.5 Hz, 1H, H-8b), 6.68 (dd, J<sub>7, 8a</sub>: 10.9 Hz, J<sub>7, 8b</sub>: 17.5 Hz, 1H, H-7), 6.80 (d, J<sub>2, 3</sub>=J<sub>6, 5</sub>: 8.6 Hz, 2H, H-2 y H-6), 7.30 (d, J<sub>3, 2</sub>=J<sub>5, 6</sub>: 8.6 Hz, 2H, H-3 y H-5).

**RMN-<sup>13</sup>C**, 75.5 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 111.69 (C-8), 115.38 (C-3, C-5), 127.62 (C-2, C-6), 130.72 (C-4), 136.15 (C-7), 155.26 (C-1).

b. Síntesis *p*-glicidil estireno (**16**).**( 16 )**

En un matraz de dos bocas de 50 mL se pesa el *p*-hidroxi estireno (**15**) (1.0 g, 8.3 mmol), se sella el sistema con tapones de teflón y se purga el sistema con una corriente de argón. A continuación, se protege la mezcla de reacción de la luz con ayuda de papel de aluminio y se añade 10 mL de una disolución de NaOH (0.33 g, 8.3 mmol). Se agita durante 5 minutos y se añade la epoclorhidrina (0.65 mL, 8.4 mmol). La reacción se mantiene bajo agitación a temperatura ambiente durante 20 horas. A la mezcla de reacción se le añaden 30 mL de éter etílico y se lava con 2 x de 10 mL de agua y 10 mL de brine. La fase orgánica se seca sobre sulfato magnésico y se elimina el disolvente en a vacio. El producto de reacción se purifica por cromatografía en columna empleando como eluyente hexano/acetato de etilo (6/1). Se obtiene 1,1 g (86%) del compuesto **16** como un sólido blanco.

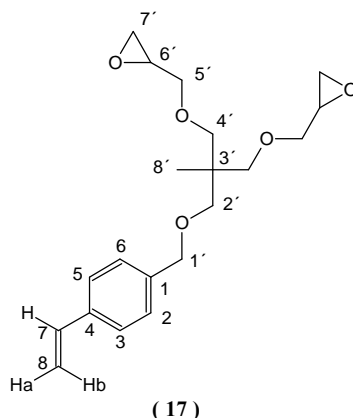
**RMN-<sup>1</sup>H**, 300 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 2.74 (dd,  $J_{3'a,3'b}$ : 5.0,  $J_{3'a,2'}$ : 2.7 Hz, 1H, H-3'a), 2.89 (dd,  $J_{3'b,3'a}$ : 5.0,  $J_{3'b,2'}$ : 4.3 Hz, 1H, H-3'b), 3.34 (dddd,  $J_{2'1'a}$ : 5.7,  $J_{2',3'b}$ : 4.3,  $J_{2',1'b}$ : 3.0,  $J_{2',3'a}$ : 2.7 Hz, 1H, H-2'), 3.95 (dd,  $J_{1'a,1'b}$ : 11.3,  $J_{1'a,2'}$ : 5.7 Hz, 1H, H-1'a), 4.21 (dd,  $J_{1'b,1'a}$ : 11.3 Hz,  $J_{1'b,2'}$ : 3.0 Hz, 1H, H-1'b), 5.13 (dd,  $J_{8a,7}$ : 10.9,  $J_{8a,8b}$ : 0.8, 1H, H-8a), 5.61 (dd,  $J_{8b,7}$ : 17.6,  $J_{8b,8a}$ : 0.8 Hz, 1H, H-8b), 6.65 (dd,  $J_{7,8b}$ : 17.6,  $J_{7,8a}$ : 10.9 Hz, 1H, H-7), 6.87 (d,  $J_{2,3} = J_{6,5}$ : 8.8 Hz, 2H, H-2 y H-6), 7.33 (m,  $J_{3,2} = J_{5,6}$ : 8.8 Hz, 2H, H-3 y H-5).

**RMN-<sup>13</sup>C**, 75.5 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 44.64 (C-3'), 50.06 (C-2'), 68.76 (C-1'), 111.85 (C-8), 114.62 (C-2, C-6), 127.37 (C-3, C-5), 130.95 (C-4), 136.08 (C-7), 158.21 (C-1).

La asignación de las señales concuerda con la asignación detallada por otro grupo de investigación.<sup>487</sup>

**MS:** - Teórica: 176.21

- Experimental (Electrospray+): 176.1 (M), 177.1 (M+H).

6.2.1.3.2. Síntesis de *p*-{2,2-bis [(glicidiloxi)metil]propanoxi}metil}estireno (17).

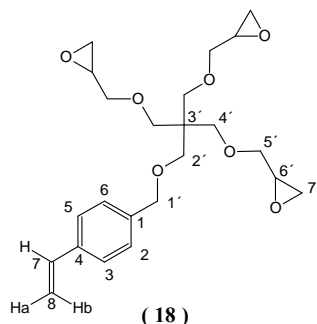
En un matraz de dos bocas de 50 mL, se introduce 2,2-bis [(glicidiloxi) metil] propan-1-ol (11) (1.0 g, 4.5 mmol) y 20 mL de THF. El sistema se sella con tapones de teflón, se purga con una corriente de argón y se coloca en un baño de hielo. Se adiciona NaH (0.12 g, 4.5 mmol) en porciones. Transcurridos 15 minutos se adiciona el *p*-clorometilestireno (1.22 mL, 8 mmol) y TBAI (0.1 g). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 18 horas y transcurrido ese tiempo se añade 30 mL de agua y se extrae con 3 x 75 mL de éter etílico. La fase orgánica se seca sobre MgSO<sub>4</sub> y se elimina el disolvente a vacío, obteniendo un aceite amarillento. El producto de reacción se purifica por cromatografía en columna empleando como eluyente hexano: acetato de etilo (1,5/1). Se obtiene 0.8 g (56%) del compuesto 17 como un aceite de color amarillo.

**RMN-<sup>1</sup>H** 300 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 0.97 (s, 3H, H-8'), 2.56 (dd,  $J_{7'a, 7'b}$ : 5.2,  $J_{7'a, 6'}$ : 2.7 Hz, 2H, H-7'a), 2.75 (dd,  $J_{7'b, 7'a}$ : 5.2,  $J_{7'b, 6'}$ : 5.2 Hz, 2H, H-7'b), 3.08 (dddd,  $J_{6', 5'a}$ : 5.6,  $J_{6', 7'b}$ : 5.2,  $J_{6', 5'b}$ : 3.0,  $J_{6', 7'a}$ : 2.7 Hz, 2H, H-6'), 3.34 (s, 2H, H-2'), 3.35 (d,  $J_{4'b, 4'a}$ : 9.0 Hz, 2H, H-4'a), 3.36 (dd,  $J_{5'a, 5'b}$ : 11.8,  $J_{5'a, 6'}$ : 5.6 Hz, 2H, H-5'a), 3.40 (d,  $J_{4'a, 4'b}$ : 9.0 Hz, 2H, H-4'b), 3.66 (dd,  $J_{5'b, 5'a}$ : 11.8,  $J_{5'b, 6'}$ : 3.0 Hz, 2H, H-5'b), 4.47 (s, 2H, H-1'), 5.21 (d,  $J_{8a, 7}$ : 11.0 Hz, 1H, H-8a), 5.72 (d,  $J_{8b, 7}$ : 17.8 Hz, 1H, H-8b), 6.70 (dd,  $J_{7, 8b}$ : 17.8,  $J_{7, 8a}$ : 11.0 Hz, H-7), 7.27 (d,  $J_{2, 3} = J_{6, 5}$ : 7.5 Hz, 2H, H-2 y H-6), 7.37 (d,  $J_{3, 2} = J_{5, 6}$ : 9.0 Hz, 2H, H-3 y H-5).

**RMN-<sup>13</sup>C**, 75.5 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 17.42 (C-8'), 41.09 (C-3'), 44.19 (C-7'), 50.86 (C-6'), 71.98 (C-5'), 72.82 (C-2'), 72.98 (C-1'), 74.01 (C-4'), 113.59 (C-8), 126.10 (C-3, C-5), 127.54 (C-2, C-6), 136.58 (C-7), 136.75 (C-4), 138.49 (C-1).

**MS:** - Teórica: 348.43

- Experimental (Electrospray+): 349.18 (M+H), 371.18 (M+Na).

6.2.1.3.3. Síntesis de *p*-[(triglicidil pentaeritritoxi) metil] estireno (**18**).

En un matraz de dos bocas de 50 mL, se introduce triglicidil pentaeritritol (**6**) (1.0 g, 3.3 mmol) y 20 mL de THF. El sistema se sella con tapones de teflón, se purga con una corriente de argón y se coloca en un baño de hielo. Se adiciona NaH (0.08 g, 2 mmol) en porciones. Transcurridos 15 minutos se adiciona el *p*-clorometilestireno (1,22 mL, 8 mmol) y TBAI (0.1 g). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 18 horas, y transcurrido ese tiempo se añade 30 mL de agua y se extrae con 3 x 75 mL de éter etílico. La fase orgánica se seca sobre MgSO<sub>4</sub> y se elimina el disolvente a presión reducida, obteniendo un aceite amarillento. El producto de reacción se purifica por cromatografía en columna empleando como eluyente hexano/acetato de etilo (1:1,5). Se obtiene 0.8 g (53%) del compuesto **18** como un aceite incoloro.

**RMN-<sup>1</sup>H**, 300 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 2.56 (dd,  $J_{7'a, 7'b}$ : 5.3,  $J_{7'a, 6'}$ : 2.8 Hz, 3H, H-7'a), 2.74 (dd,  $J_{7'b, 7'a}$ : 5.3,  $J_{7'b, 6'}$ : 4.3 Hz, 3H, H-7'b), 3.08 (dddd,  $J_{6, 5'a}$ : 5.8,  $J_{6', 7'b}$ : 4.3,  $J_{6', 5'b}$ : 3.0,  $J_{6', 7'a}$ : 2.8 Hz, 3H, H-6'), 3.36 (dd,  $J_{5'a, 5'b}$ : 11.8,  $J_{5'a, 6'}$ : 5.8 Hz, 3H, H-5'a), 3.46 (s, 2H, H-2'), 3.48 (d,  $J_{4'a, 4'b}$ : 9.3 Hz, 3H, H-4'a), 3.52 (d,  $J_{4'b, 4'a}$ : 9.3 Hz, 3H, H-4'b), 3.66 (dd,  $J_{5'b, 5'a}$ : 11.8,  $J_{5'b, 6'}$ : 3.0 Hz, H-5'b), 4.46 (s, 2H, H-1'), 5.21 (dd,  $J_{8a, 7}$ : 10.7,  $J_{8a, 8b}$ : 0.7 Hz, 1H, H-8a), 5.72 (dd,  $J_{8b, 7}$ : 17.5,  $J_{8b, 8a}$ : 0.7 Hz, 1H, H-8b), 6.69 (dd,  $J_{7, 8b}$ : 17.5,  $J_{7, 8a}$ : 10.7 Hz, 1H, H-7), 7.26 (d,  $J_{2, 3} = J_{6, 5}$ : 8.3 Hz, 2H, H-3 y H-6), 7.36 (d,  $J_{3, 2} = J_{5, 6}$ : 8.3 Hz 2H, H-2 y H-5).

**RMN-<sup>13</sup>C**, 75.5 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 44.18 (C-7'), 45.69 (C-3'), 50.79 (C-6'), 68.95 (C-2'), 70.08 (C-4'), 72.01 (C-5'), 73.00 (C-1'), 113.60 (C-8), 126.07 (C-3, C-5), 127.60 (C-2, C-6), 136.59 (C-7), 136.75 (C-4), 138.41 (C-1).

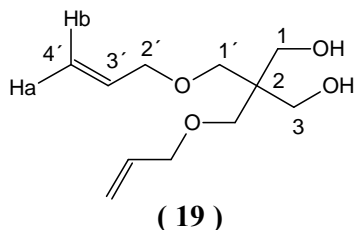
**MS:** - Teórica: 420.50

- Experimental (Electrospray+): 421.2 (M+H), 443.2 (M+Na).



## 6.2.2. Síntesis de agente de entrecruzamiento.

### 6.2.2.1. Síntesis de dialil pentaeritritol éter (19).



En un matraz de tres bocas de 50 mL provisto de refrigerante, se introducen pentaeritritol (**4**) (1.0 g, 73.5 mmol) y 15 mL de dioxano. Se agita durante unos minutos y se añade una disolución de hidróxido sódico (0.88 g, 220 mmol en 5mL de agua). La mezcla de reacción se agita durante 30 minutos a 45°C. A continuación, se añade, gota a gota, sobre la mezcla de reacción, bromuro de alilo (1.9 mL, 220 mmol) y se mantiene durante 20 horas bajo agitación a una temperatura de 45-47° C. Posteriormente se filtra la mezcla de reacción y se elimina el disolvente a vacío. El producto de reacción se purifica por cromatografía en columna utilizando como eluyente hexano: acetato de etilo (1:1). Se obtiene 0.7 g (46%) del compuesto **19** como un aceite transparente.

**RMN-<sup>1</sup>H**, 300 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 2.69 (s ancho, 2H, OH), 3.51 (s, 4H, H-1'), 3.66 (d, J: 6.0 Hz, 4H, H-1 y H-3), 3.96 (dt, J: 5.5 Hz, J: 1,4 Hz, 4H, H-2'), 5.17 (ddd, J<sub>4'a, 3'</sub>: 10.3, J<sub>4'a, 4'b</sub>: 2.8, J<sub>4'a, 2'</sub>: 1.4 Hz, 2H, H-4'a), 5.24 (ddd, J<sub>4'b, 3'</sub>: 17.2, J<sub>4'b, 4'a</sub>: 2.8, J<sub>4'b, 2'</sub>: 1.4 Hz, 2H, H-4'b), 5.86 (ddt, J<sub>3', 4'b</sub>: 17.2, J<sub>3', 4'a</sub>: 10.3, J<sub>3', 2'</sub>: 5.5 Hz, 2H, H-3').

**RMN-<sup>13</sup>C**, 75.5 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 44.78 (C-2), 64.96 (C-1, C-3), 72.05 (C-1'), 72.55 (C-2'), 117.16 (C-4'), 134.28 (C-3').

La asignación de las señales del concuerda con la asignación detallada por otro grupo de investigación.<sup>481</sup>

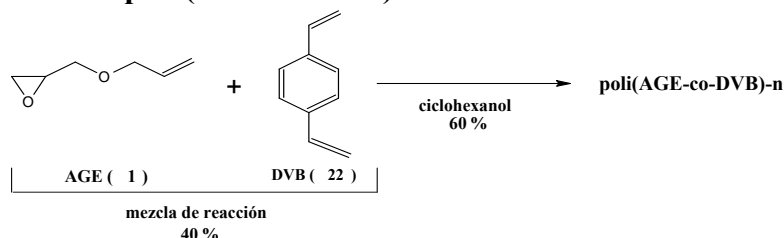
**MS:** - Teórica: 216.27

- Experimental (Electrospray+): 217.14 (M+H).

### 6.2.3. Síntesis de soportes poliméricos.

#### 6.2.3.1. Síntesis de polímeros de alquinoxiranos con agente de entrecruzamiento arílico.

##### 6.2.3.1.1. Síntesis de poli (AGE-co-DVB)-n.



Esquema 42. Síntesis de poli(AGE-co-DVB)-n.

- **Procedimiento general (n= 1-72):**

En un tubo de ensayo, se pesa la mezcla de reacción compuesta por AGE (0.6 g, n= 1-48; 0.5 g, n= 49-56; 0.7 g, n= 57-66; 0.8 g, n= 67-69; 0.9 g, n= 70-72) y DVB (0.4 g, n= 1-48; 0.5 g, n= 49-56; 0.3 g, n= 57-66; 0.2 g, n= 67-69; 0.1 g, n= 70-72) y se añaden 1.5 g (1.58 mL) de ciclohexanol. El tubo de ensayo, provisto de un agitador magnético, se sella con un septum de teflón y se purga el sistema con una corriente de argón. Posteriormente se añade el iniciador radicalario (ver Tabla 139) y se vuelve a purgar el sistema. Finalmente, se introduce el tubo de ensayo en un baño de silicona a la temperatura seleccionada (ver Tabla 140), durante 12 horas, observándose la formación de un sólido. Se tritura el sólido formado y se lava sucesivamente con acetona, agua y metanol. Posteriormente, se seca en un horno de bolas a 50°C durante 12 horas a presión reducida.

Tabla 139 Síntesis de poli(AGE-co-DVB)-n (n= 1-72): Iniciador radicalario.

Entrada (n)	AIBN (g)	P.B. (g)
1, 5, 9, 13, 21, 49, 53, 57 y 63	0.01	
2, 6, 10, 14, 18, 22, 50, 54, 58, 64, 67 y 70	0.05	
3, 7, 11, 15, 19, 23, 51, 55, 59, 68 y 71	0.10	
4, 8, 12, 16, 20, 24, 60, 69 y 72	0.15	
25, 29, 33, 37, 41, 45, 51, 55, 56, 61, 65 y 66		0.01
26, 30, 34, 38, 42, 46, 52 y 62		0.05
27, 31, 35, 39, 43 y 47		0.10
28, 32, 36, 40, 44 y 48		0.15

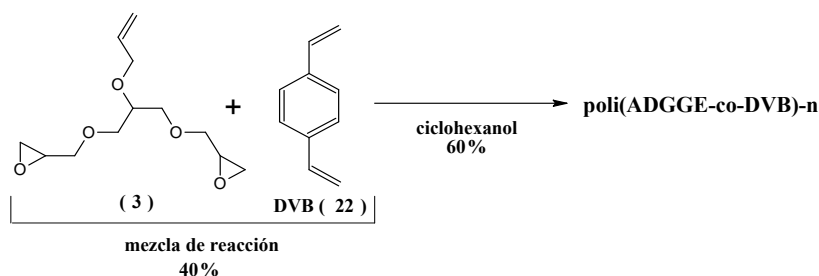
Tabla 140. Síntesis de poli(AGE-co-DVB)-n (n= 1-72): Temperatura.

Entrada (n)	Temperatura (°C)
1-8, 25-32, 49-52, 57-62 y 67-72	70
9-16, 33-40, 53-55 y 63-65	90
17-24, 41-48, 56, y 66	120

- **Procedimiento general (n=73-75).**

En un tubo de ensayo, se pesa la mezcla de reacción compuesta por AGE (0.6 g, n= 73; 0.7 g, n= 74; 0.8 g, n= 75) y DVB (0.4 g, n= 73; 0.3 g, n= 74; 0.2 g, n= 75) y se añaden 0.43 g de Tween 80 y 1.5 g (1.58 mL) de ciclohexanol. El tubo de ensayo, provisto de un agitador magnético, se sella con un septum de teflón y se purga el sistema con una corriente de argón. Posteriormente se añade AIBN (0.15 g, n= 73; 0.05 g, n= 74; 0.1 g, n= 75) y se vuelve a purgar el sistema. Finalmente, se introduce el tubo de ensayo en un baño de silicona a 70°C durante 12 horas, observándose la formación de un sólido. Se tritura el sólido formado y se lava sucesivamente con acetona, agua y metanol. Posteriormente, se seca a 50°C durante 12 horas a presión reducida.

### 6.2.3.1.2. Síntesis de poli (ADGGE-co-DVB)-n.



Esquema 43. Síntesis de poli(ADGGE-co-DVB)-n.

- **Procedimiento general (n= 1-52):**

En un tubo de ensayo, se pesa la mezcla de reacción compuesta por ADGGE (0.6 g, n= 1-48; 0.7 g, n= 49-50; 0.8 g, n= 51,52) y DVB (0.4 g, n= 1-48; 0.3 g, n= 49-50; 0.2 g, n= 51-52) y se añaden 1.5 g (1.58 mL) de ciclohexanol. El tubo de ensayo, provisto de un agitador magnético, se sella con un septum de teflón y se purga el sistema con una corriente de argón. Posteriormente se añade el iniciador radicalario (ver Tabla 141) y se vuelve a purgar el sistema. Finalmente, se introduce el tubo de ensayo en un baño de silicona a la temperatura seleccionada (ver Tabla 142), durante 12 horas, observándose la formación de un sólido. Se tritura el sólido formado y se lava sucesivamente con acetona, agua y metanol. Posteriormente, se seca en un horno de bolas a 50°C durante 12 horas a presión reducida.

**Tabla 141.** Síntesis de poli(ADGGE-co-DVB)-n (n= 1-52): Iniciador radicalario.

Entrada (n)	AIBN (g)	P.B. (g)
1, 5, 9, 13 y 21	0.01	
2, 6, 10, 14, 18, 22, 49 y 51	0.05	
3, 7, 11, 15, 19, 23, 50 y 52	0.10	
4, 8, 12, 16, 20 y 24	0.15	
25, 29, 33, 37, 41 y 45		0.01
26, 30, 34, 38, 42 y 46		0.05
27, 31, 35, 39, 43 y 47		0.10
28, 32, 36, 40, 44 y 48		0.15

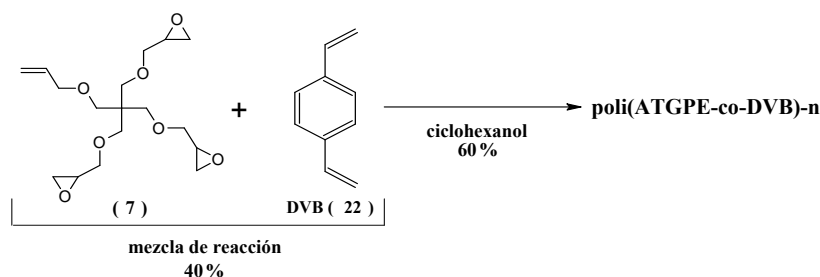
**Tabla 142.** Síntesis de poli(ADGGE-*co*-DVB)-n (n= 1-52): Temperatura.

Entrada ( n )	Temperatura (°C)
1-8, 25-32	70
9-16, 33-40, 49-52	90
17-24, 41-48	120

- **Procedimiento general (n=53-55).**

En un tubo de ensayo, se pesa la mezcla de reacción compuesta por ADGGE (0.6 g, n= 53, 54; 0.7 g, n= 55) y DVB (0.4 g, n= 53, 54; 0.3 g, n= 55) y se añaden 0.43 g de Tween 80 y 1.5 g (1.58 mL) de ciclohexanol. El tubo de ensayo, provisto de un agitador magnético, se sella con un septum de teflón y se purga el sistema con una corriente de argón. Posteriormente se añade AIBN (0.05 g, n= 54; 0.10 g, n= 53, 55) y se vuelve a purgar el sistema. Finalmente, se introduce el tubo de ensayo en un baño de silicona a 70°C durante 12 horas, observándose la formación de un sólido. Se tritura el sólido formado y se lava sucesivamente con acetona, agua y metanol. Posteriormente, se seca a 50°C durante 12 horas a presión reducida.

### 6.2.3.1.3. Síntesis de poli(ATGPE-*co*-DVB)-n.



**Esquema 44.** Síntesis de poli(ATGPE-*co*-DVB)-n.

- **Procedimiento general (n= 1-24):**

En un tubo de ensayo, se pesa la mezcla de reacción compuesta por ATGPE (0.6 g, n= 1-18; 0.7 g, n= 19-21) y DVB (0.4 g, n= 1-18; 0.3 g, n= 19-21) y se añaden 1.5 g (1.58 mL) de ciclohexanol. El tubo de ensayo, provisto de un agitador magnético, se sella con un septum de teflón y se purga el sistema con una corriente de argón. Posteriormente se añade el iniciador radicalario (ver Tabla 143) y se vuelve a purgar el sistema. Finalmente, se introduce el tubo de ensayo en un baño de silicona a la temperatura seleccionada (ver Tabla 144), durante 12 horas, observándose la formación de un sólido. Se tritura el sólido formado y se lava sucesivamente con acetona, agua y metanol. Posteriormente, se seca en un horno de bolas a 50°C durante 12 horas a presión reducida.

**Tabla 143.** Síntesis de poli(ATGPE-co-DVB)-n (n= 1-21): Iniciador radicalario.

Entrada (n)	AIBN (g)	P.B. (g)
1, 7, 13 y 20	0.01	
2, 8, 14 y 19	0.05	
3, 9 y 15	0.10	
4, 10, 16 y 21		0.01
5, 11 y 17		0.05
6, 12 y 18		0.10

**Tabla 144.** Síntesis de poli(ATGPE-co-DVB)-n (n= 1-21): Temperatura.

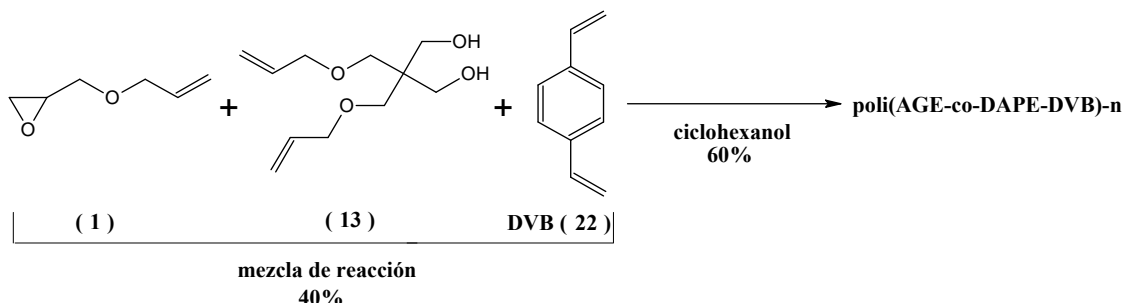
Entrada (n)	Temperatura (°C)
1-6, 19	70
7-12	90
13-18, 20 y 21	120

- **Procedimiento general (n=22-24).**

En un tubo de ensayo, se pesa la mezcla de reacción compuesta por ADGGE (0.6 g) y DVB con estabilizante (0.4 g n= 53, 54; 0.3 g, n= 55) y 0.43 g de Tween 80, y se añaden 1.5 g (1.58 mL) de ciclohexanol. El tubo de ensayo, provisto de un agitador magnético, se sella con un septum de teflón y se purga el sistema con una corriente de argón. Posteriormente se añade, como iniciador radicalario, AIBN (0.01 g, n= 23; 0.05 g, n= 22) ó PB (0.01 g, n= 24) y se vuelve a purgar el sistema. Finalmente, se introduce el tubo de ensayo en un baño de silicona a 70°C (n= 22) ó 120°C (n= 23, 24) y se agita durante 12 horas, observándose la formación de un sólido. Se tritura el sólido formado y se lava sucesivamente con acetona, agua y metanol. Posteriormente, se seca a 50°C durante 12 horas a presión reducida.

### 6.2.3.2. Síntesis de polímeros de alquioxiranos con mezcla de agentes de entrecruzamiento alquílico y arílico.

#### 6.2.3.2.1. Síntesis de poli(AGE-co-DAPE-DVB)-n.



**Esquema 45.** Síntesis de poli(AGE-co-DAPE-DVB)-n.

- **Procedimiento general (n= 1-15).**

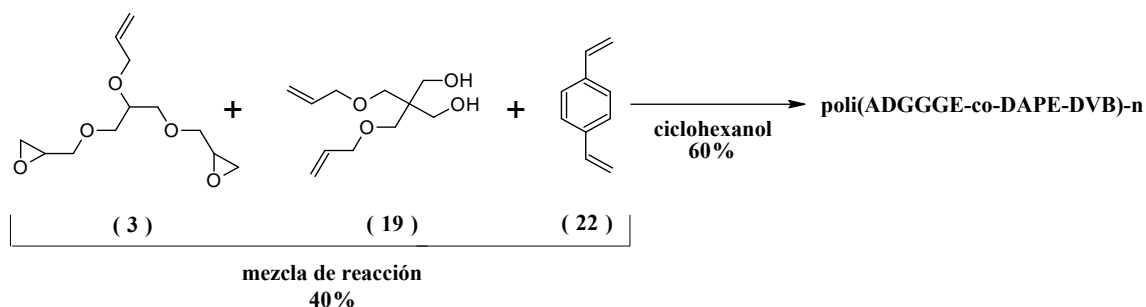
En un tubo de ensayo, se pesa la mezcla de reacción compuesta por AGE (0.5 g, n= 1-7; 0.6 g, n= 8-11; 0.7 g, n= 12-15), DAPE (0.25 g, n= 1-7; 0.20 g, n= 8-11; 0.10 g, n= 12-15) y

DVB (0.25 g, n= 1-7; 0.2 g, n= 8-15). A continuación se añade 1.5 g (1.58 mL) de ciclohexanol y el tubo de ensayo, provisto de un agitador magnético, se sella con un septum de teflón y se purga el sistema con una corriente de argón. Posteriormente se añade el iniciador radicalario, AIBN, (0.01 g, n= 1, 5, 11 y 15; 0.05 g, n= 2, 6, 8, 12; 0.10 g, n= 3, 7, 9 y 13; 0.15 g, n= 4, 10, 14, 16) y se vuelve a purgar el sistema. Finalmente, se introduce el tubo de ensayo en un baño de silicona a la de 70°C (n= 1-4, 8-10 y 12-14) ó 90°C (n= 5-7, 11 y 15) y se agita durante 12 horas, al cabo de las cuales se tritura el sólido formado y se lava sucesivamente con acetona, agua y metanol. Posteriormente, se seca en un horno de bolas a 50°C durante 12 horas a presión reducida.

- **Procedimiento general (n=16-20).**

En un tubo de ensayo, se pesa la mezcla de reacción compuesta por AGE (0.5 g, n= 16; 0.6 g, n= 17, 18; 0.7 g, n= 19 y 20), DAPE (0.25 g, n= 16; 0.20 g, n= 17 y 18; 0.10 g, n= 19 y 20) y DVB (0.25 g, n= 16; 0.2 g, n= 17-20) y 0.43 g de Tween 80. A continuación se añade 1.5 g (1.58 mL) de ciclohexanol. El tubo de ensayo, provisto de un agitador magnético, se sella con un septum de teflón y se purga el sistema con una corriente de argón. Posteriormente se añade, como iniciador radicalario, AIBN (0.05 g, n= 19; 0.10 g, n= 17, 20; 0.15 g, n= 16, 18) y se vuelve a purgar el sistema. Finalmente, se introduce el tubo de ensayo en un baño de silicona a 70°C y se agita durante 12 horas, observándose la formación de un sólido. Se tritura el sólido formado y se lava sucesivamente con acetona, agua y metanol. Posteriormente, se seca a 50°C durante 12 horas a presión reducida.

### 6.2.3.2.2. Síntesis de poli(ADGGE-co-DAPE-DVB)-n



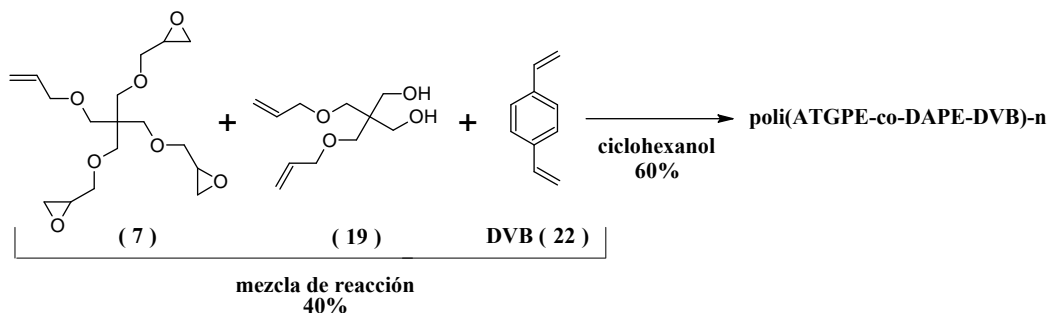
**Esquema 46.** Síntesis de poli(ADGGE-co-DAPE-DVB)-n.

- **Procedimiento general (n= 1-12).**

En un tubo de ensayo, se pesa la mezcla de reacción compuesta por ADGGE (0.5 g, n= 1-6; 0.25 g, n= 7-12), DAPE (0.25 g, n= 1-6; 0.50 g, n= 7-12) y 0.25 g de DVB con. A continuación se añade 1.5 g (1.58 mL) de ciclohexanol y el tubo de ensayo, provisto de un agitador magnético, se sella con un septum de teflón y se purga el sistema con una corriente de argón. Posteriormente se añade el iniciador radicalario, AIBN (0.01 g, n= 1, 4, 7, 10; 0.05 g, n= 2, 5, 8, 11; 0.10 g, n= 3, 6, 9, 12) y se vuelve a purgar el sistema. Finalmente, se introduce el

tubo de ensayo en un baño de silicona a la de 70°C (n= 1-3, 7-9) ó 90°C (n= 4-6, 10-12) y se agita durante 12 horas, al cabo de las cuales se tritura el sólido formado y se lava sucesivamente con acetona, agua y metanol. Posteriormente, se seca en un horno de bolas a 50°C durante 12 horas a presión reducida.

### 6.2.3.2.3. Síntesis de poli(ATGPE-co-DAPE-DVB)-n.



Esquema 47. Síntesis de poli(ATGPE-co-DAPE-DVB)-n.

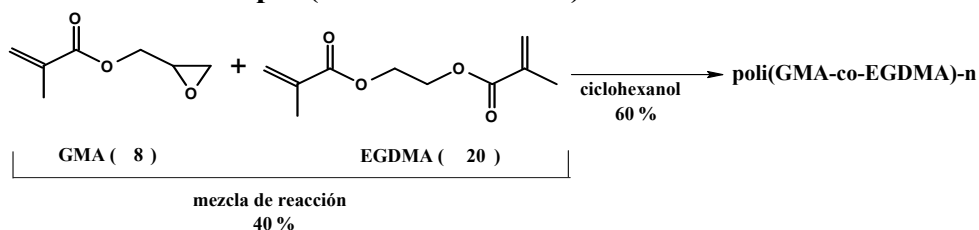
- **Procedimiento general (n= 1-12).**

En un tubo de ensayo, se pesa la mezcla de reacción compuesta por ATGPE (0.5 g, n= 1-6; 0.25 g, n= 7-12), DAPE (0.25 g, n= 1-6; 0.50 g, n= 7-12) y 0.25 g de DVB con. A continuación se añade 1.5 g (1.58 mL) de ciclohexanol y el tubo de ensayo, provisto de un agitador magnético, se sella con un septum de teflón y se purga el sistema con una corriente de argón. Posteriormente se añade el iniciador radicalario, AIBN (0.01 g, n= 1, 4, 7, 10; 0.05 g, n= 2, 5, 8, 11; 0.10 g, n= 3, 6, 9, 12) y se vuelve a purgar el sistema. Finalmente, se introduce el tubo de ensayo en un baño de silicona a la de 70°C (n= 1-3, 7-9) ó 90°C (n= 4-6, 10-12) y se agita durante 12 horas, al cabo de las cuales se tritura el sólido formado y se lava sucesivamente con acetona, agua y metanol. Posteriormente, se seca en un horno de bolas a 50°C durante 12 horas a presión reducida.

### 6.2.3.3. Síntesis de polímeros de metacriloxiranos.

#### 6.2.3.3.1. Síntesis de polímeros de metacriloxiranos con agente de entrecruzamiento metacrílico.

##### 6.2.3.3.1.1. Síntesis de poli(GMA-co-EGDMA)-n.



Esquema 48. Síntesis de poli(GMA-co-EGDMA)-n.

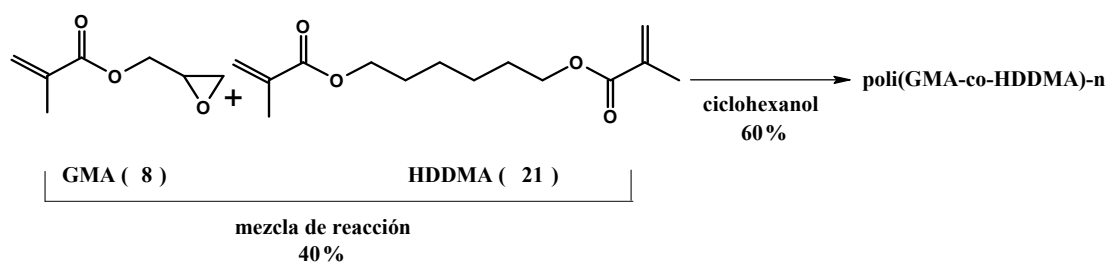
- **Procedimiento general (n= 1-12).**

En un tubo de ensayo, se pesa la mezcla de reacción compuesta por GMA (0.6 g, n= 1-6; 0.7 g, n= 7-12) y EGDMA (0.4 g, n= 1-6; 0.3 g, n= 7-12). A continuación se añade 1.5 g (1.58 mL) de ciclohexanol y el tubo de ensayo, provisto de un agitador magnético, se sella con un septum de teflón y se purga el sistema con una corriente de argón. Posteriormente se añade el iniciador radicalario, AIBN, (0.01 g, n= 1, 4, 7 y 10; 0.05 g, n= 2, 5, 8 y 11; 0.10 g, n= 3, 6, 9 y 12) y se vuelve a purgar el sistema. Finalmente, se introduce el tubo de ensayo en un baño de silicona a la de 50°C (n= 1-3 y 7-9) ó 70°C (n= 4-6 y 10-12) y se agita durante 12 horas, al cabo de las cuales se tritura el sólido formado y se lava sucesivamente con acetona, agua y metanol. Posteriormente, se seca en un horno de bolas a 50°C durante 12 horas a presión reducida.

- **Procedimiento general (n=12-15).**

En un tubo de ensayo, se pesa la mezcla de reacción compuesta por GMA (0.6 g, n= 13, 14; 0.7 g, n= 15), EGDMA (0.4 g, n= 13, 14; 0.3 g, n= 15) y 0.43 g de Tween 80. A continuación se añade 1.5 g (1.58 mL) de ciclohexanol. El tubo de ensayo, provisto de un agitador magnético, se sella con un septum de teflón y se purga el sistema con una corriente de argón. Posteriormente se añade, como iniciador radicalario, AIBN (0.01 g, n= 13; 0.05 g, n= 15; 0.10 g, n= 14) y se vuelve a purgar el sistema. Finalmente, se introduce el tubo de ensayo en un baño de silicona a una temperatura de 50°C (n= 13) ó 70°C (n= 14, 15) y se agita durante 12 horas, observándose la formación de un sólido. Se tritura el sólido formado y se lava sucesivamente con acetona, agua y metanol. Posteriormente, se seca a 50°C durante 12 horas a presión reducida.

### 6.2.3.3.1.2. Síntesis de poli(GMA-co-HDDMA)-n.



Esquema 49. Síntesis de poli(GMA-co-HDDMA)-n.

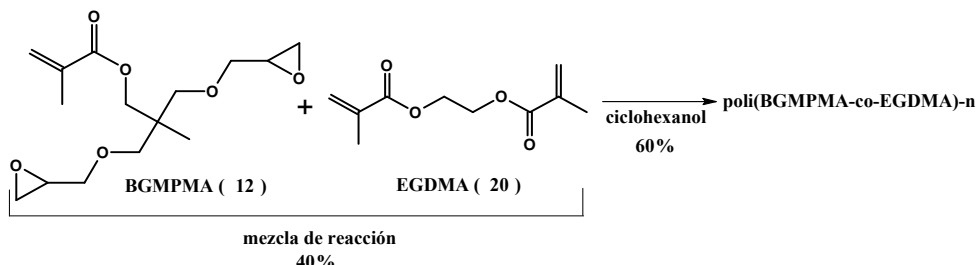
- **Procedimiento general (n= 1-12).**

En un tubo de ensayo, se pesa la mezcla de reacción compuesta por GMA (0.6 g, n= 1-6; 0.7 g, n= 7-12) y HDDMA (0.4 g, n= 1-6; 0.3 g, n= 7-12). A continuación se añade 1.5 g (1.58 mL) de ciclohexanol y el tubo de ensayo, provisto de un agitador magnético, se sella con un septum de teflón y se purga el sistema con una corriente de argón. Posteriormente se añade el iniciador radicalario, AIBN, (0.01 g, n= 1, 4, 7 y 10; 0.05 g, n= 2, 5, 8 y 11; 0.10 g, n= 3, 6, 9 y 12) y se vuelve a purgar el sistema. Finalmente, se introduce el tubo de ensayo en un baño de



silicona a la de 50°C (n= 1-3 y 7-9) ó 70°C (n= 4-6 y 10-12) y se agita durante 12 horas, al cabo de las cuales se tritura el sólido formado y se lava sucesivamente con acetona, agua y metanol. Posteriormente, se seca en un horno de bolas a 50°C durante 12 horas a presión reducida.

### 6.2.3.3.1.3. Síntesis de poli(BGMPMA-co-EGDMA)-n.

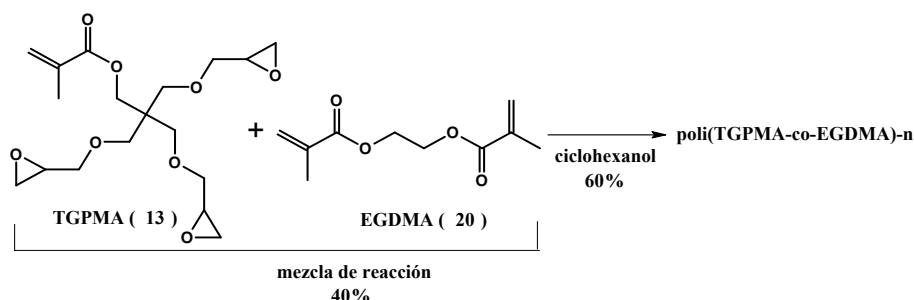


Esquema 50. Síntesis de poli(BGMPMA-co-EGDMA)-n

- **Procedimiento general (n= 1-12).**

En un tubo de ensayo, se pesa la mezcla de reacción compuesta por BGMPMA (0.6 g, n= 1-6; 0.7 g, n= 7-12) y EGDMA (0.4 g, n= 1-6; 0.3 g, n= 7-12). A continuación se añade 1.5 g (1.58 mL) de ciclohexanol y el tubo de ensayo, provisto de un agitador magnético, se sella con un septum de teflón y se purga el sistema con una corriente de argón. Posteriormente se añade el iniciador radicalario, AIBN, (0.01 g, n= 1, 4, 7 y 10; 0.05 g, n= 2, 5, 8 y 11; 0.10 g, n= 3, 6, 9 y 12) y se vuelve a purgar el sistema. Finalmente, se introduce el tubo de ensayo en un baño de silicona a la de 50°C (n= 1-3 y 7-9) ó 70°C (n= 4-6 y 10-12) y se agita durante 12 horas, al cabo de las cuales se tritura el sólido formado y se lava sucesivamente con acetona, agua y metanol. Posteriormente, se seca en un horno de bolas a 50°C durante 12 horas a presión reducida.

### 6.2.3.3.1.4. Síntesis de poli(TGPMA-co-EGDMA)-n.



Esquema 51. Síntesis de poli(TGPMA-co-EGDMA)-n.

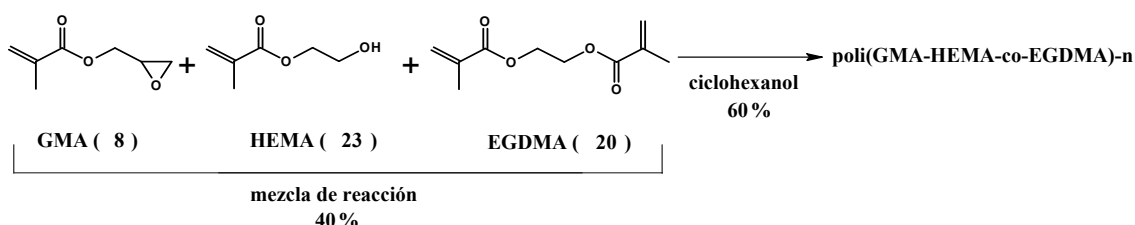
- **Procedimiento general (n= 1-12).**

En un tubo de ensayo, se pesa la mezcla de reacción compuesta por TGPMA (0.6 g, n= 1-6; 0.7 g, n= 7-12) y EGDMA (0.4 g, n= 1-6; 0.3 g, n= 7-12). A continuación se añade 1.5 g (1.58 mL) de ciclohexanol y el tubo de ensayo, provisto de un agitador magnético, se sella con

un septum de teflón y se purga el sistema con una corriente de argón. Posteriormente se añade el iniciador radicalario, AIBN, (0.01 g, n= 1, 4, 7 y 10; 0.05 g, n= 2, 5, 8 y 11; 0.10 g, n= 3, 6, 9 y 12) y se vuelve a purgar el sistema. Finalmente, se introduce el tubo de ensayo en un baño de silicona a la de 50°C (n= 1-3 y 7-9) ó 70°C (n= 4-6 y 10-12) y se agita durante 12 horas, al cabo de las cuales se tritura el sólido formado y se lava sucesivamente con acetona, agua y metanol. Posteriormente, se seca en un horno de bolas a 50°C durante 12 horas a presión reducida.

### 6.2.3.3.2. Síntesis de polímeros de metacriloxiranos y monómero metacrílico, con un grupo hidroxilo, con un agente de entrecruzamiento metacrílico.

#### 6.2.3.3.2.1. Síntesis de poli(GMA-HEMA-co-EGDMA)-n.

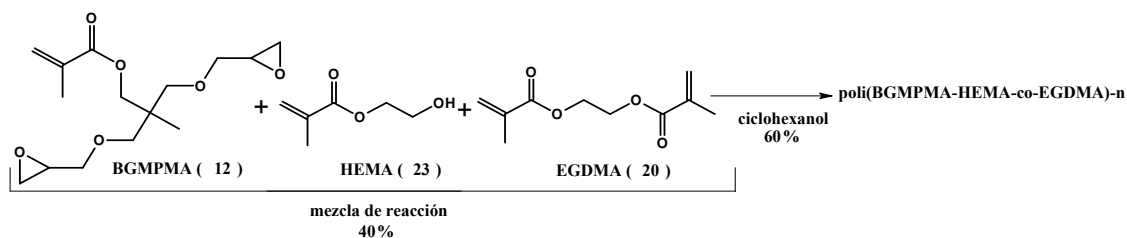


Esquema 52. Síntesis de poli(GMA-HEMA-co-EGDMA)-n.

- **Procedimiento general (n= 1-12).**

En un tubo de ensayo, se pesa la mezcla de reacción compuesta por GMA (0.3 g, n= 1-6; 0.35 g, n= 7-12), HEMA (0.3 g, n= 1-6; 0.35 g, n= 7-12) y EGDMA (0.4 g, n= 1-6; 0.3 g, n= 7-12). A continuación se añade 1.5 g (1.58 mL) de ciclohexanol y el tubo de ensayo, provisto de un agitador magnético, se sella con un septum de teflón y se purga el sistema con una corriente de argón. Posteriormente se añade el iniciador radicalario, AIBN, (0.01 g, n= 1, 4, 7 y 10; 0.05 g, n= 2, 5, 8 y 11; 0.10 g, n= 3, 6, 9 y 12) y se vuelve a purgar el sistema. Finalmente, se introduce el tubo de ensayo en un baño de silicona a la de 50°C (n= 1-3 y 7-9) ó 70°C (n= 4-6 y 10-12) y se agita durante 12 horas, al cabo de las cuales se tritura el sólido formado y se lava sucesivamente con acetona, agua y metanol. Posteriormente, se seca en un horno de bolas a 50°C durante 12 horas a presión reducida.

#### 6.2.3.3.2.2. Síntesis de poli(BGMPMA-HEMA-co-EGDMA)-n.

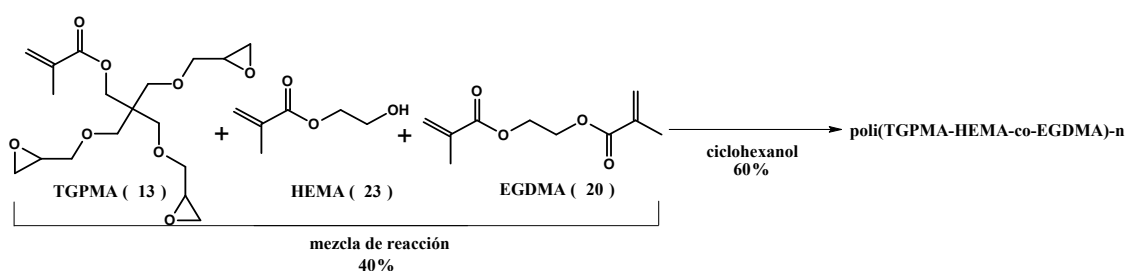


Esquema 53. Síntesis de poli(BGMPMA-HEMA-co-EGDMA)-n.

- **Procedimiento general (n= 1-12).**

En un tubo de ensayo, se pesa la mezcla de reacción compuesta por BGMPMA (0.3 g, n= 1-6; 0.35 g, n= 7-12), HEMA (0.3 g, n= 1-6; 0.35 g, n= 7-12) y EGDMA (0.4 g, n= 1-6; 0.3 g, n= 7-12). A continuación se añade 1.5 g (1.58 mL) de ciclohexanol y el tubo de ensayo, provisto de un agitador magnético, se sella con un septum de teflón y se purga el sistema con una corriente de argón. Posteriormente se añade el iniciador radicalario, AIBN, (0.01 g, n= 1, 4, 7 y 10; 0.05 g, n= 2, 5, 8 y 11; 0.10 g, n= 3, 6, 9 y 12) y se vuelve a purgar el sistema. Finalmente, se introduce el tubo de ensayo en un baño de silicona a la de 50°C (n= 1-3 y 7-9) ó 70°C (n= 4-6 y 10-12) y se agita durante 12 horas, al cabo de las cuales se tritura el sólido formado y se lava sucesivamente con acetona, agua y metanol. Posteriormente, se seca en un horno de bolas a 50°C durante 12 horas a presión reducida.

### 6.2.3.3.2.3. Síntesis de poli(TGPMA-HEMA-co-EGDMA)-n.



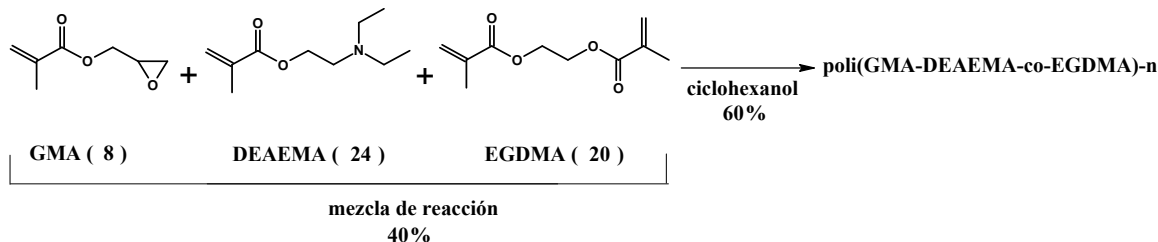
**Esquema 54.** Síntesis de poli(TGPMA-HEMA-co-EGDMA)-n

- **Procedimiento general (n= 1-12).**

En un tubo de ensayo, se pesa la mezcla de reacción compuesta por TGPMA (0.3 g, n= 1-6; 0.35 g, n= 7-12), HEMA (0.3 g, n= 1-6; 0.35 g, n= 7-12) y EGDMA (0.4 g, n= 1-6; 0.3 g, n= 7-12). A continuación se añade 1.5 g (1.58 mL) de ciclohexanol y el tubo de ensayo, provisto de un agitador magnético, se sella con un septum de teflón y se purga el sistema con una corriente de argón. Posteriormente se añade el iniciador radicalario, AIBN, (0.01 g, n= 1, 4, 7 y 10; 0.05 g, n= 2, 5, 8 y 11; 0.10 g, n= 3, 6, 9 y 12) y se vuelve a purgar el sistema. Finalmente, se introduce el tubo de ensayo en un baño de silicona a la de 50°C (n= 1-3 y 7-9) ó 70°C (n= 4-6 y 10-12) y se agita durante 12 horas, al cabo de las cuales se tritura el sólido formado y se lava sucesivamente con acetona, agua y metanol. Posteriormente, se seca en un horno de bolas a 50°C durante 12 horas a presión reducida.

### 6.2.3.3. Síntesis de polímeros de metacriloxiranos y monómero metacrílico, con un grupo amino, con un agente de entrecruzamiento metacrílico.

#### 6.2.3.3.3.1. Síntesis de poli(GMA-DEAEMA-co-EGDMA)-n.

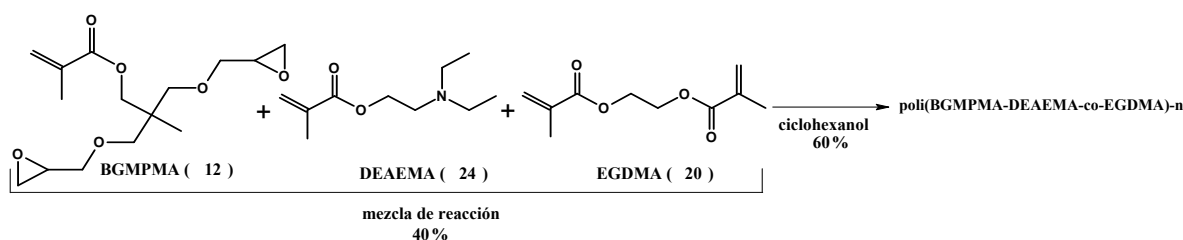


Esquema 55. Síntesis de poli(GMA-DEAEMA-co-EGDMA)-n.

- **Procedimiento general (n= 1-12).**

En un tubo de ensayo, se pesa la mezcla de reacción compuesta por GMA (0.3 g, n= 1-6; 0.35 g, n= 7-12), DEAEMA (0.3 g, n= 1-6; 0.35 g, n= 7-12) y EGDMA (0.4 g, n= 1-6; 0.3 g, n= 7-12). A continuación se añade 1.5 g (1.58 mL) de ciclohexanol y el tubo de ensayo, provisto de un agitador magnético, se sella con un septum de teflón y se purga el sistema con una corriente de argón. Posteriormente se añade el iniciador radicalario, AIBN, (0.01 g, n= 1, 4, 7 y 10; 0.05 g, n= 2, 5, 8 y 11; 0.10 g, n= 3, 6, 9 y 12) y se vuelve a purgar el sistema. Finalmente, se introduce el tubo de ensayo en un baño de silicona a la de 50°C (n= 1-3 y 7-9) ó 70°C (n= 4-6 y 10-12) y se agita durante 12 horas, al cabo de las cuales se tritura el sólido formado y se lava sucesivamente con acetona, agua y metanol. Posteriormente, se seca en un horno de bolas a 50°C durante 12 horas a presión reducida.

#### 6.2.3.3.3.2. Síntesis de poli(BGMPMA-DEAEMA-co-EGDMA)-n.



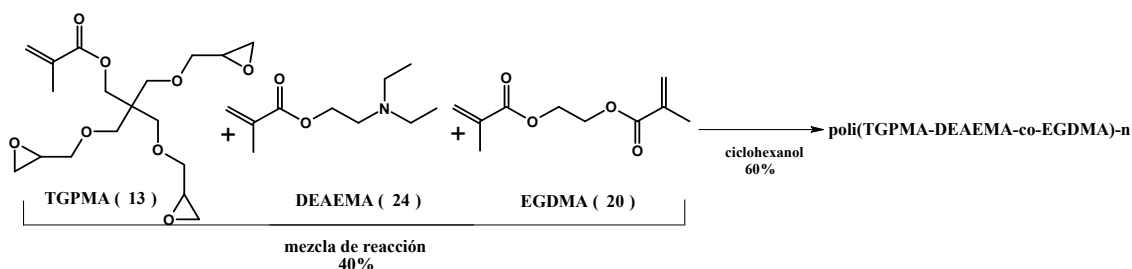
Esquema 56. Síntesis de poli(BGMPMA-DEAEMA-co-EGDMA)-n.

- **Procedimiento general (n= 1-12).**

En un tubo de ensayo, se pesa la mezcla de reacción compuesta por BGMPMA (0.3 g, n= 1-6; 0.35 g, n= 7-12), DEAEMA (0.3 g, n= 1-6; 0.35 g, n= 7-12) y EGDMA (0.4 g, n= 1-6; 0.3 g, n= 7-12). A continuación se añade 1.5 g (1.58 mL) de ciclohexanol y el tubo de ensayo, provisto de un agitador magnético, se sella con un septum de teflón y se purga el sistema con una corriente de argón. Posteriormente se añade el iniciador radicalario, AIBN, (0.01 g, n= 1, 4,

7 y 10; 0.05 g, n= 2, 5, 8 y 11; 0.10 g, n= 3, 6, 9 y 12) y se vuelve a purgar el sistema. Finalmente, se introduce el tubo de ensayo en un baño de silicona a la de 50°C (n= 1-3 y 7-9) ó 70°C (n= 4-6 y 10-12) y se agita durante 12 horas, al cabo de las cuales se tritura el sólido formado y se lava sucesivamente con acetona, agua y metanol. Posteriormente, se seca en un horno de bolas a 50°C durante 12 horas a presión reducida.

#### 6.2.3.4.3.3. Síntesis de poli(TGPMA-DEAEMA-co-EGDMA)-n.



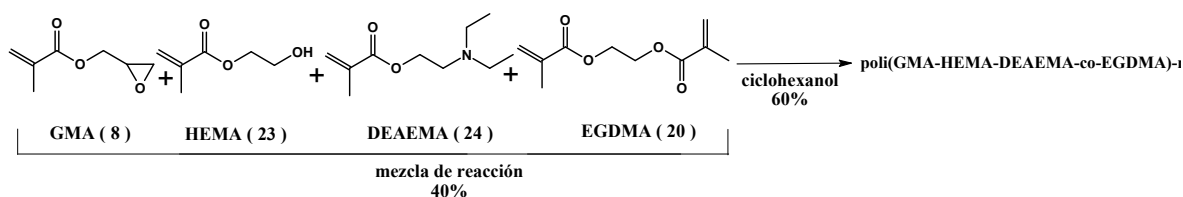
Esquema 57. Síntesis de poli(TGPMA-DEAEMA-co-EGDMA)-n.

- **Procedimiento general (n= 1-12).**

En un tubo de ensayo, se pesa la mezcla de reacción compuesta por TGPMA (0.3 g, n= 1-6; 0.35 g, n= 7-12), DEAEMA (0.3 g, n= 1-6; 0.35 g, n= 7-12) y EGDMA (0.4 g, n= 1-6; 0.3 g, n= 7-12). A continuación se añade 1.5 g (1.58 mL) de ciclohexanol y el tubo de ensayo, provisto de un agitador magnético, se sella con un septum de teflón y se purga el sistema con una corriente de argón. Posteriormente se añade el iniciador radicalario, AIBN, (0.01 g, n= 1, 4, 7 y 10; 0.05 g, n= 2, 5, 8 y 11; 0.10 g, n= 3, 6, 9 y 12) y se vuelve a purgar el sistema. Finalmente, se introduce el tubo de ensayo en un baño de silicona a la de 50°C (n= 1-3 y 7-9) ó 70°C (n= 4-6 y 10-12) y se agita durante 12 horas, al cabo de las cuales se tritura el sólido formado y se lava sucesivamente con acetona, agua y metanol. Posteriormente, se seca en un horno de bolas a 50°C durante 12 horas a presión reducida.

#### 6.2.3.3.4. Síntesis de polímeros de metacriloxiranos, monómero metacrílico funcionalizado con un grupo hidroxilo y monómero metacrílico funcionalizado con un grupo amino, con un agente de entrecruzamiento metacrílico.

##### 6.2.3.3.4.1. Síntesis de poli(GMA-HEMA-DEAEMA-co-EGDMA)-n.

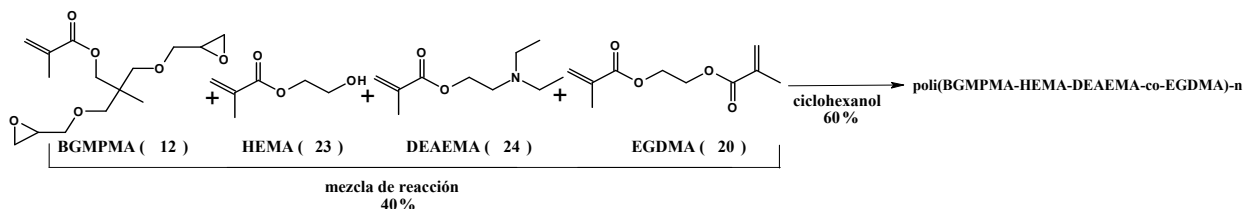


Esquema 58. Síntesis de poli(GMA-HEMA-DEAEMA-co-EGDMA)-n.

- **Procedimiento general (n= 1-12).**

En un tubo de ensayo, se pesa la mezcla de reacción compuesta por GMA (0.3 g, n= 1-6; 0.40 g, n= 7-12), HEMA (0.15 g), DEAEMA (0.15 g) y EGDMA (0.4 g, n= 1-6; 0.3 g, n= 7-12). A continuación se añade 1.5 g (1.58 mL) de ciclohexanol y el tubo de ensayo, provisto de un agitador magnético, se sella con un septum de teflón y se purga el sistema con una corriente de argón. Posteriormente se añade el iniciador radicalario, AIBN, (0.01 g, n= 1, 4, 7 y 10; 0.05 g, n= 2, 5, 8 y 11; 0.10 g, n= 3, 6, 9 y 12) y se vuelve a purgar el sistema. Finalmente, se introduce el tubo de ensayo en un baño de silicona a la de 50°C (n= 1-3 y 7-9) ó 70°C (n= 4-6 y 10-12) y se agita durante 12 horas, al cabo de las cuales se tritura el sólido formado y se lava sucesivamente con acetona, agua y metanol. Posteriormente, se seca en un horno de bolas a 50°C durante 12 horas a presión reducida.

#### 6.2.3.3.4.2. Síntesis de poli(BGMPMA-HEMA-DEAEMA-co-EGDMA)-n.

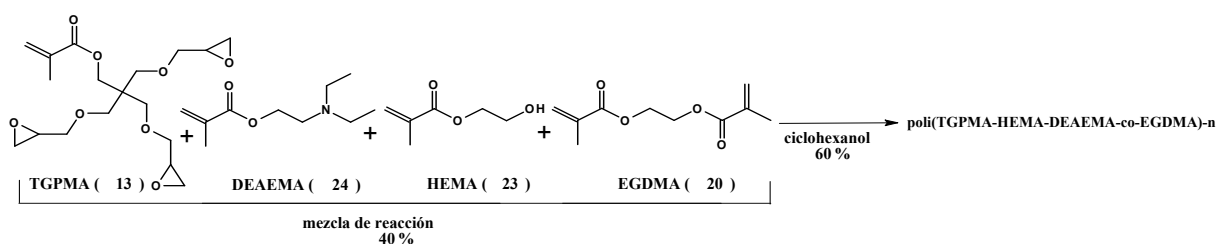


**Esquema 59.** Síntesis de poli(BGMPMA-HEMA-DEAEMA-co-EGDMA)-n.

- **Procedimiento general (n= 1-12).**

En un tubo de ensayo, se pesa la mezcla de reacción compuesta por BGMPMA (0.3 g, n= 1-6; 0.40 g, n= 7-12), HEMA (0.15 g), DEAEMA (0.15 g) y EGDMA (0.4 g, n= 1-6; 0.3 g, n= 7-12). A continuación se añade 1.5 g (1.58 mL) de ciclohexanol y el tubo de ensayo, provisto de un agitador magnético, se sella con un septum de teflón y se purga el sistema con una corriente de argón. Posteriormente se añade el iniciador radicalario, AIBN, (0.01 g, n= 1, 4, 7 y 10; 0.05 g, n= 2, 5, 8 y 11; 0.10 g, n= 3, 6, 9 y 12) y se vuelve a purgar el sistema. Finalmente, se introduce el tubo de ensayo en un baño de silicona a la de 50°C (n= 1-3 y 7-9) ó 70°C (n= 4-6 y 10-12) y se agita durante 12 horas, al cabo de las cuales se tritura el sólido formado y se lava sucesivamente con acetona, agua y metanol. Posteriormente, se seca en un horno de bolas a 50°C durante 12 horas a presión reducida.

### 6.2.3.3.4.3. Síntesis de poli(TGPMA-HEMA-DEAEMA-co-EGDMA)-n.



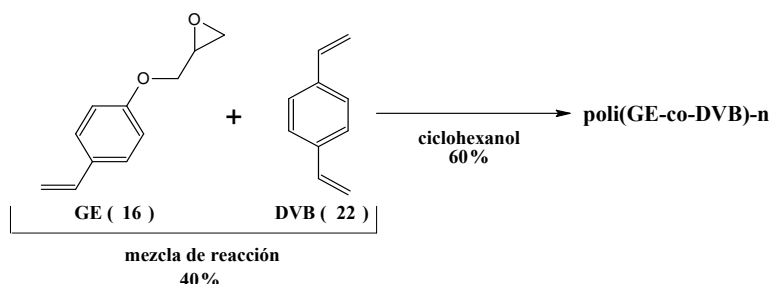
Esquema 60. Síntesis de poli(TGPMA-HEMA-DEAEMA-co-EGDMA)-n.

- **Procedimiento general (n= 1-12).**

En un tubo de ensayo, se pesa la mezcla de reacción compuesta por TGPMA (0.3 g, n= 1-6; 0.40 g, n= 7-12), HEMA (0.15 g), DEAEMA (0.15 g) y EGDMA (0.4 g, n= 1-6; 0.3 g, n= 7-12). A continuación se añade 1.5 g (1.58 mL) de ciclohexanol y el tubo de ensayo, provisto de un agitador magnético, se sella con un septum de teflón y se purga el sistema con una corriente de argón. Posteriormente se añade el iniciador radicalario, AIBN, (0.01 g, n= 1, 4, 7 y 10; 0.05 g, n= 2, 5, 8 y 11; 0.10 g, n= 3, 6, 9 y 12) y se vuelve a purgar el sistema. Finalmente, se introduce el tubo de ensayo en un baño de silicona a la de 50°C (n= 1-3 y 7-9) ó 70°C (n= 4-6 y 10-12) y se agita durante 12 horas, al cabo de las cuales se tritura el sólido formado y se lava sucesivamente con acetona, agua y metanol. Posteriormente, se seca en un horno de bolas a 50°C durante 12 horas a presión reducida.

### 6.2.3.4. Síntesis de polímeros de ariloxiranos con agentes de entrecruzamiento arílico.

#### 6.2.3.4.1. Síntesis de poli(GE-co-DVB)-n.



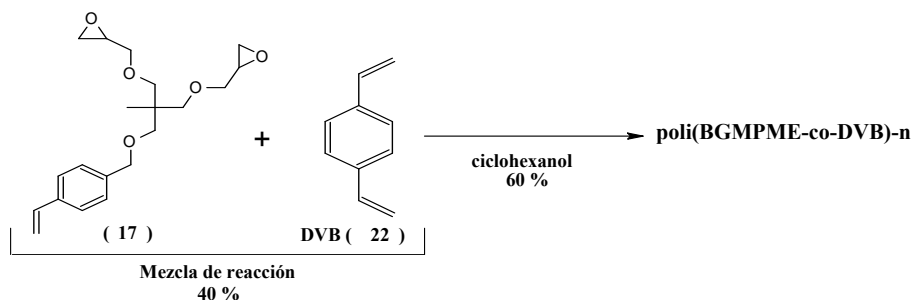
Esquema 61. Síntesis de poli(GE-co-DVB)-n.

- **Procedimiento general (n= 1-4).**

En un tubo de ensayo, se pesa la mezcla de reacción compuesta por GE (0.6 g, n= 1-2; 0.75 g, n= 3, 4) y DVB (0.4 g, n= 1-2; 0.25 g, n= 3, 4) y se añaden 1.5 g (1.58 mL) de ciclohexanol. El tubo de ensayo, provisto de un agitador magnético, se sella con un septum de teflón y se purga el sistema con una corriente de argón. Posteriormente se añade el iniciador

radicalario AIBN (0.01 g, n= 1, 3; 0.05 g, n= 2, 4) y se vuelve a purgar el sistema. Finalmente, se introduce el tubo de ensayo en un baño de silicona una temperatura de 70°C durante 12 horas, observándose la formación de un sólido. Se tritura el sólido formado y se lava sucesivamente con acetona, agua y metanol. Posteriormente, se seca en un horno de bolas a 50°C durante 12 horas a presión reducida.

#### 6.2.3.4.2. Síntesis de poli(BGMPME-co-DVB)-n.

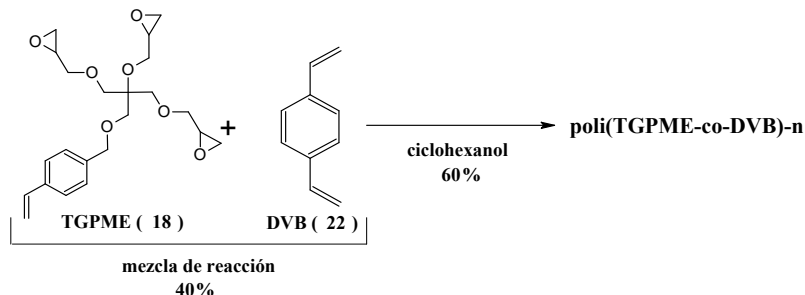


Esquema 62. Síntesis de poli(BGMPME-co-DVB)-n.

- **Procedimiento general (n= 1-6).**

En un tubo de ensayo, se pesa la mezcla de reacción compuesta por BGMPME (0.75 g, n= 1-2; 0.6 g, n= 3, 4; 0.5 g, n= 5, 6) y DVB (0.25 g, n= 1-2; 0.40 g, n= 3, 4; 0.50 g, n= 5, 6) y se añaden 1.5 g (1.58 mL) de ciclohexanol. El tubo de ensayo, provisto de un agitador magnético, se sella con un septum de teflón y se purga el sistema con una corriente de argón. Posteriormente se añade el iniciador radicalario AIBN (0.01 g, n= 1, 3, 5; 0.05 g, n= 2, 4, 6) y se vuelve a purgar el sistema. Finalmente, se introduce el tubo de ensayo en un baño de silicona una temperatura de 70°C durante 12 horas, observándose la formación de un sólido. Se tritura el sólido formado y se lava sucesivamente con acetona, agua y metanol. Posteriormente, se seca en un horno de bolas a 50°C durante 12 horas a presión reducida.

#### 6.2.3.4.3. Síntesis de poli(TGPME-co-DVB)-n.



Esquema 63. Síntesis de poli(BGMPME-co-DVB)-n.

- **Procedimiento general (n= 1-8).**

En un tubo de ensayo, se pesa la mezcla de reacción compuesta por TGPME (0.75 g, n= 1-2; 0.6 g, n= 3, 4; 0.5 g, n= 5, 6; 0.4 g, n= 7, 8) y DVB (0.25 g, n= 1-2; 0.40 g, n= 3, 4; 0.50 g,



n= 5, 6; 0.6 g, n= 7, 8) y se añaden 1.5 g (1.58 mL) de ciclohexanol. El tubo de ensayo, provisto de un agitador magnético, se sella con un septum de teflón y se purga el sistema con una corriente de argón. Posteriormente se añade el iniciador radicalario AIBN (0.01 g, n= 1, 3, 5, 7; 0.05 g, n= 2, 4, 6, 8) y se vuelve a purgar el sistema. Finalmente, se introduce el tubo de ensayo en un baño de silicona una temperatura de 70°C durante 12 horas, observándose la formación de un sólido. Se tritura el sólido formado y se lava sucesivamente con acetona, agua y metanol. Posteriormente, se seca en un horno de bolas a 50°C durante 12 horas a presión reducida.

### **6.3. Inmovilización-estabilización de enzimas.**

#### **6.3.1. Inmovilización-estabilización de Glicosidasas.**

##### **6.3.1.1. Inmovilización-estabilización de $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans* (Biolacta).**

###### **6.3.1.1.1. Caracterización de $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans* (Biolacta)**

- **Determinación de proteínas en el preparado enzimático comercial.**

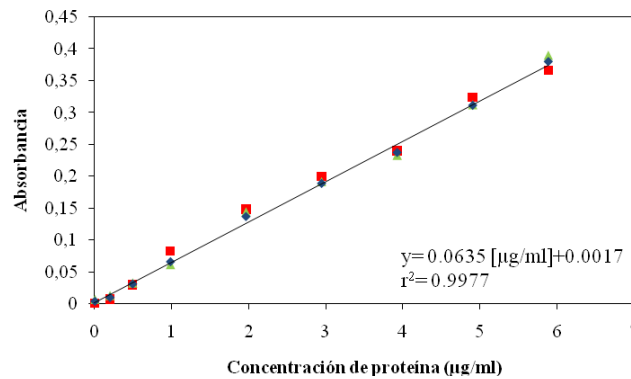
Se determinó la cantidad de proteína en el preparado enzimático comercial según el método Bradford,<sup>573</sup> que se basa en la variación en el espectro de absorción visible del colorante azul brillante de Coomassie G-250 en presencia de una proteína. La adsorción del colorante a la proteína provoca que la absorbancia máxima del colorante se desplace de 465 a 595 nm.

La preparación del reactivo de Bradford se llevo a cabo partiendo de un concentrado comercial de Bio-Rad siguiendo las instrucciones del fabricante. Como patrón de proteína para realizar una recta de calibración se empleó una solución de seroalbúmina bovina (SBA) de concentración 1mg/mL en disolución tampón Tris/HCl 10 mM pH 7.3. Se realizaron disoluciones sucesivas de la proteína patrón como se muestra en la Tabla 145, completándose con disolución tampón hasta un volumen final de 0.1 mL. A continuación se añadieron 5 mL de reactivo de Bradford y se agitó vigorosamente. Después se midió la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro. La adsorción del colorante a la proteína se produce instantáneamente, siendo máxima y estable entre los 5 y 20 primeros minutos. Todos los ensayos se realizan a temperatura ambiente y por triplicado.

Los resultados de la absorbancia en función de la concentración de proteína, en  $\mu\text{g/mL}$ , obtenidos se ajustaron a un modelo poli nómico de primer grado según el programa estadístico POLNOM del paquete informático SIMFIT (Figura 181).

**Tabla 145.** Disoluciones sucesivas de proteína patrón para realizar la recta de calibrado en la determinación de proteínas por el método de Bradford.<sup>573</sup>

Nº tubo	Proteína (BSA) (µl)	Tampón (µl)	Bradford (mL)	Proteína (µg/mL)
0	0,0	100,0	5,0	0,000
1	1,0	99,0	5,0	0,196
2	2,5	97,5	5,0	0,490
3	5,0	95,0	5,0	0,980
4	10,0	90,0	5,0	1,960
5	15,0	85,0	5,0	2,941
6	20,0	80,0	5,0	3,921
7	25,0	75,0	5,0	4,901
8	30,0	70,0	5,0	5,882



**Figura 181.** Recta de calibrado para la determinación de cantidad de proteínas por el método de Bradford.<sup>573</sup>

Para determinar el porcentaje de enzima en el preparado enzimático comercial de  $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans*, se preparo una disolución 0.5 mg/mL de enzima, de esta disolución se tomaron 0.10 mL, se añadieron 5 mL de reactivo de Bradford, se agitó vigorosamente, se esperó 5 minutos y se midió la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro. Por extrapolación del valor de absorbancia en la recta de calibrado, se obtiene la concentración de proteína en la muestra (µg/mL), y a partir de este dato se calcula el porcentaje de enzima en el preparado comercial.

- **Determinación de la actividad enzimática de  $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans* libre.**

Se determino la cantidad de *p*-nitrofenol (PNF) liberado en el medio de reacción mediante espectroscopia UV/vis a 410 nm para un pH de 7.3, en la reacción de hidrólisis enzimática del *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (PNF- $\beta$ -gal). La reacción se realizó añadiendo a una cubeta de cuarzo, de 1 cm de espesor, 1440µl de tampón Tris/HCl 10 mM pH 7.3 y 960 µl de la solución 6.25 mM *p*-nitrofenol- $\beta$ -galactosa preparada con el tampón Tris/HCl 10 mM pH 7.3. La mezcla permaneció 5 minutos hasta que alcanzó la temperatura de trabajo deseada (37°C) y posteriormente se añadieron 600 µl de la solución enzimática siguiéndose la reacción durante 1 minutos.

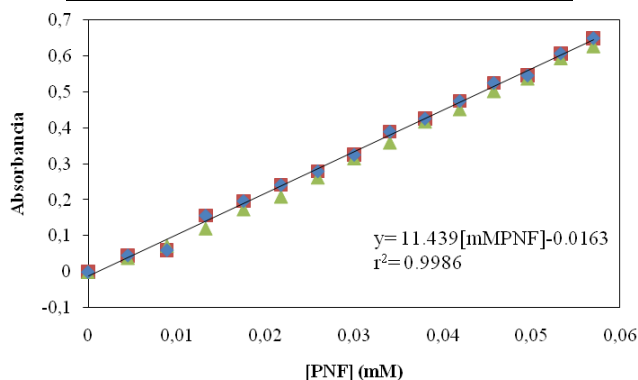
El PNF liberado se cuantifica espectrofotométricamente mediante extrapolación de los valores de absorbancia obtenidos en una recta de calibrado realizada previamente a 410 nm. Para obtener la recta de calibrado se prepararon disoluciones sucesivas de PNF en solución tampón Tris/HCl 10 mM pH 7.3, como se muestra en la Tabla 146.

La recta de calibrado se representa en la Figura 182, y se ajustó a un modelo polinómico de primer grado según el programa estadístico POLNOM del paquete informático SIMFIT.

En todos los casos los experimentos se realizaron por triplicado y el resultado final se indicó como la media aritmética de los tres valores obtenidos con un error máximo del 5%. La velocidad inicial se calculo en  $\mu\text{moles}$  de PNF liberado por minuto.

**Tabla 146.** Disoluciones sucesivas de *p*-nitrofenol para las rectas de calibrado.

N° tubo	Concentración (mM)
0	0
1	0.0049
2	0.00891
3	0.01327
4	0.01755
5	0.02177
6	0.02592
7	0.03002
8	0.03405
9	0.03801
10	0.04193
11	0.04578
12	0.04958
13	0.05332
14	0.05701



**Figura 182.** Recta de calibrado de *p*-nitrofenol a pH 7.3.

### 6.3.1.1.2. Procedimiento de inmovilización-estabilización de $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans*.

En primer lugar se llevó a cabo un screening para seleccionar el mejor polímero (el que presenta mayor carga enzimática y mayor actividad catalítica), para la inmovilización de la  $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans*.

- **Procedimiento de inmovilización para la selección del polímero.**

En tubos de plástico de 2.5 mL, con tapón de rosca, se pesaron 20 mg de cada polímero sintetizado y se añadieron 2 mL de una disolución de preparado enzimático comercial 10 mg/mL (0.5 mg enzima/mL, 3.5 U mg<sup>-1</sup>), preparada con una solución tampón Tris/HCl 50 mM pH 7.3 y 500 mM NaCl, la mezcla se agitó hasta homogenización, y se tomó una alícuota para determinar la cantidad de enzima y actividad inicial. A continuación, se colocan en un agitador tipo noria, y se agitaron a temperatura ambiente y 40 r.p.m. durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se filtró el derivado inmovilizado utilizando un embudo Buchner y se llevaron a cabo diferentes lavados del derivado inmovilizado, utilizando en cada uno de ellos 1.5 mL de solución tampón Tris/HCl 10 mM pH 7.3, hasta eliminar todo el porcentaje de enzima no unidas covalentemente al soporte. Los filtrados de lavado se liofilizaron, para posteriormente disolverlos en un volumen determinado de solución tampón Tris/HCl 10 mM pH 7.3 y calcular la cantidad de enzima desorbida del soporte en el lavado.

Para bloquear los grupos oxirano del soporte que no han reaccionado con la enzima, el derivado inmovilizado se incubó en 2 mL de una solución de glicina 3 M pH 8.5 durante 16 horas a una temperatura de 25° C. Posteriormente, el derivado inmovilizado se lavó con agua destilada y se liofilizó. Posteriormente se preparó en grandes cantidades el mejor derivado seleccionado en el apartado anterior.

- **Procedimiento de inmovilización para obtener la cantidad del derivado inmovilizado necesaria para llevar a cabo la aplicación sintética.**

En un matraz erlenmeyer de 25 mL, se pesaron 200 mg de preparado enzimático ( $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans*, BIOLACTA N°5), se añadieron 10 mL de Tris/HCl 50 mM pH 7.3 y 500 mM NaCl, la mezcla se agitó hasta su disolución, y se tomó una alícuota para determinar la cantidad de enzima y actividad inicial. A continuación se añadieron 400 mg de poli (AGE-co-DVB)-100 y la reacción se agitó durante 24 horas a 25° C en un agitador orbitalico a 150 rev/min. Se tomaron alícuotas del sobrenadante cada 2 horas durante las 10 primeras horas, y una final a las 24 horas para determinar la cantidad de enzima unida al soporte en cada momento. Una vez transcurridas las 24 horas, se filtró el derivado inmovilizado utilizando un embudo Buchner y se llevaron a cabo diferentes lavados del derivado utilizando en cada uno de ellos 1.5 mL de solución tampón Tris/HCl 10 mM pH 7.3 para eliminar las moléculas de enzima no unidas covalentemente al soporte. Los filtrados de lavado se liofilizaron, para posteriormente disolverlos en un volumen determinado de solución tampón Tris/HCl 10 mM pH 7.3 y calcular la cantidad de enzima desorbida del soporte en el lavado.

Para bloquear los grupos oxirano del soporte que no han reaccionado con la enzima, el derivado inmovilizado se incubó en 10 mL de una solución de glicina 3 M pH 8.5 durante 16 horas a una

temperatura de 25° C. Posteriormente, el derivado inmovilizado se lavó con agua destilada y se liofilizó.

#### 6.3.1.1.3. Caracterización del derivado inmovilizado de $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans*.

- **Determinación de la cantidad de proteína inmovilizada en los soportes.**

Se determinó según el método Bradford,<sup>573</sup> la cantidad de enzima presente en las alícuotas de sobrenadante tomadas durante la inmovilización de la enzima, así como en los líquidos de lavado del derivado inmovilizado. Para ello se tomaron 100  $\mu$ l de la disolución enzimática ó sobrenadante, se añadieron 5 mL del reactivo de Bradford y se agitó vigorosamente. Después se midió la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro. Todos los ensayos se realizan a temperatura ambiente y por triplicado.

El porcentaje de enzima anclada al soporte se determinó por la diferencia entre la concentración de enzima inicial y las concentraciones medidas en las alícuotas tomadas durante el anclaje y en los líquidos de lavado del derivado inmovilizado.

- **Determinación de la actividad enzimática de los derivados inmovilizados.**

Se determinó la cantidad de PNF liberado en el medio de reacción mediante espectroscopia UV/vis a 410 nm, en la reacción de hidrólisis enzimática de *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido. La reacción se realizó añadiendo a la cubeta de cuarzo (de 1 cm de espesor y dotada de un sistema de agitación magnético) 2040  $\mu$ l de tampón Tris/HCl 10 mM pH 7.3 y 2 mg de derivado inmovilizado (0.095 mg de  $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans*). La mezcla permaneció 5 minutos hasta que alcanzó la temperatura de trabajo deseada (37°C) y posteriormente se añadieron 960  $\mu$ l de la solución 6.25 mM *p*-nitrofenol- $\beta$ -galactosa preparada con el tampón Tris/HCl 10 mM pH 7.3, siguiéndose la reacción durante 1 minuto. En todos los casos las experiencias se realizaron por triplicado y el resultado final se indicó como la media aritmética de los tres valores obtenidos con un error máximo del 5%.

El PNF liberado se cuantifica espectrofotométricamente mediante extrapolación de los valores de absorbancia obtenidos en una recta de calibrado realizada previamente a 410 nm.

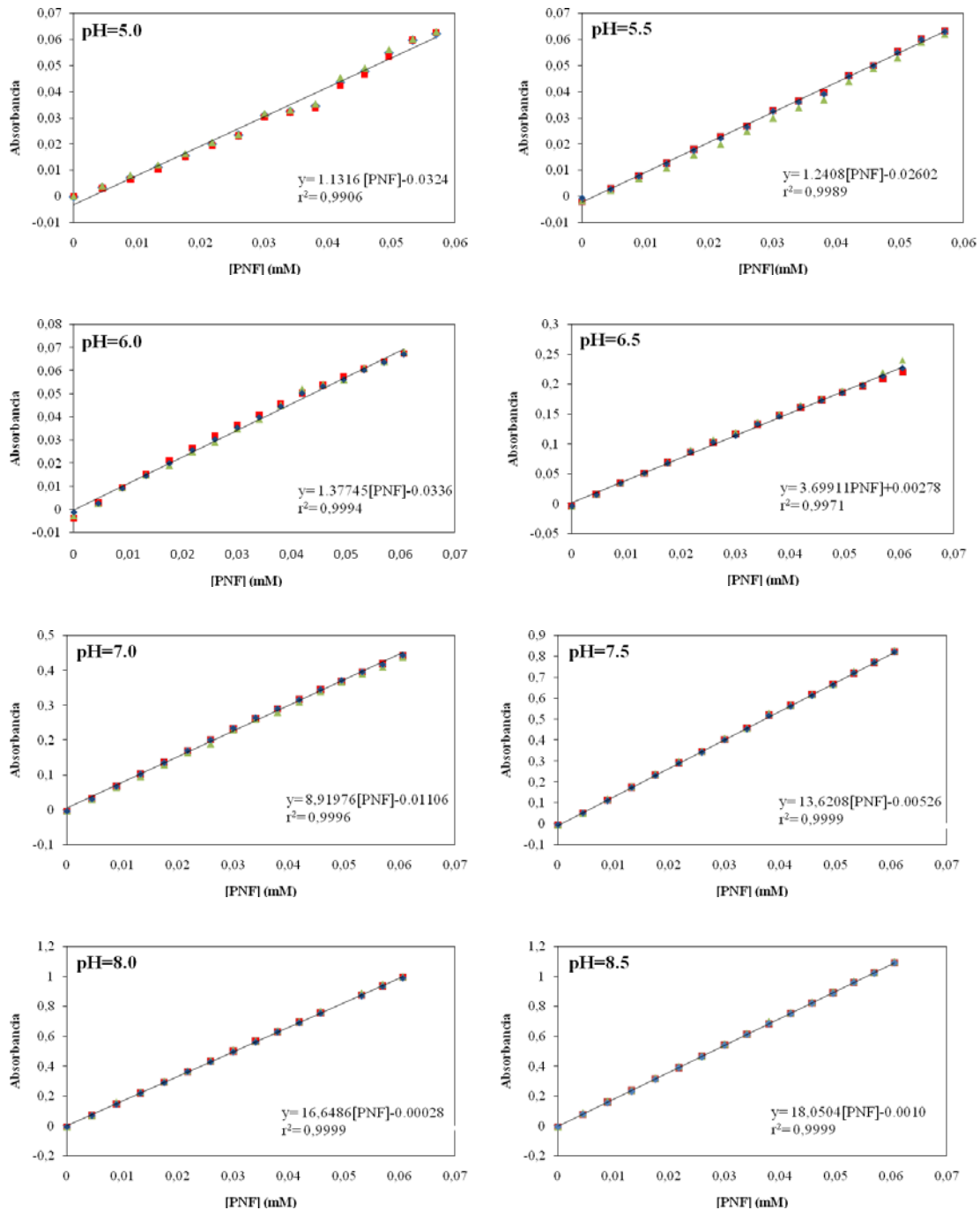
- **Efecto del pH en la actividad catalítica de los derivados inmovilizados.**

Utilizando el mejor derivado inmovilizado de la  $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans* preparado en el apartado 6.3.1.1.2 se llevó a cabo el estudio del efecto del pH en la actividad catalítica del derivado inmovilizado en las condiciones descritas en el apartado 6.3.1.1.3. Estos experimentos se llevaron a cabo con las siguientes disoluciones tampón a diferentes pH:

- Tampón citrato/fosfato 50 mM: pH 5.0, 5.5.
- Tampón fosfato sódico 50 mM: pH 6.0, 6.5, 7.0.
- Tampón Tris/HCl 50 mM: pH 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5.

El PNF liberado se cuantifica espectrofotométricamente mediante extrapolación de los valores de absorbancia obtenidos en una recta de calibrado realizada previamente a 410 nm. Para ello se prepararon disoluciones sucesivas de PNF con las soluciones tampón de los diferentes pHs, como se muestra en la Tabla 146, y

Las rectas de calibrado de PNF para los diferentes pHs se representa en la Figura 183, y se ajustaron a un modelo poli nómico de primer grado según el programa estadístico POLNOM del paquete informático SIMFIT.



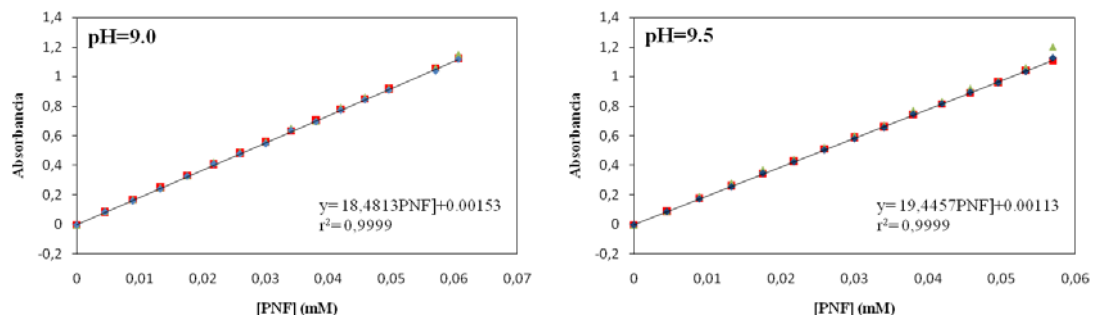


Figura 183. Rectas de calibración de PNF a diferentes pHs.

- **Estabilidad térmica de los derivados inmovilizados.**

Se analizó la estabilidad térmica de la enzima libre y la enzima inmovilizada sobre poli (AGE-co-DVB)-100 a 37°C y 50°C. Para este estudio se analizó la actividad enzimática de ambos preparados enzimáticos (enzima libre y enzima inmovilizada, 0.032 mg de enzima/mL) sometido a calentamiento (37°C y 50°C) a los tiempos 0h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h, 12h, 24h, 36h y 48h.

La determinación de la actividad enzimática se llevó a cabo en las condiciones descritas en el apartado 6.3.1.1.3.

### 6.3.1.2. Inmovilización-estabilización de $\beta$ -galactosidasa de *Escherichia coli*.

#### 6.3.1.2.1. Caracterización de $\beta$ -galactosidasa de *Escherichia coli*.

- **Determinación de proteínas en el preparado enzimático comercial.**

Se determinó la cantidad de proteína en el preparado enzimático comercial según el método Bradford,<sup>573</sup> siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.3.1.1.1.

- **Determinación de la actividad enzimática de  $\beta$ -galactosidasa de *Escherichia coli* libre.**

Se determinó la actividad enzimática del preparado enzimático comercial según el método que aparece descrito en el apartado 6.3.1.1.1.

#### 6.3.1.2.2. Procedimiento de inmovilización-estabilización de $\beta$ -galactosidasa de *Escherichia coli*.

Se llevó a cabo la inmovilización-estabilización de la  $\beta$ -galactosidasa de *Escherichia coli* siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.3.1.1.2.

### **6.3.1.2.3. Caracterización del derivado inmovilizado de $\beta$ -galactosidasa de *Escherichia coli*.**

- **Determinación de la cantidad de proteína inmovilizada en los soportes.**

Se determino según el método Bradford,<sup>573</sup> siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.3.1.1.3.

- **Determinación de la actividad enzimática de los derivados inmovilizados.**

Se determino la cantidad de PNF liberado en el medio de reacción mediante espectroscopia UV/vis a 410 nm, en la reacción de hidrólisis enzimática de *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.3.1.1.3.

### **6.3.1.3. Inmovilización-estabilización de $\beta$ -galactosidasa recombinante de *Bacillus circulans* $\beta$ -gal-3 ATCC 31382.**

#### **6.3.1.3.1. Caracterización de $\beta$ -galactosidasa recombinante de *Bacillus circulans* $\beta$ -gal-3 ATCC 31382.**

- **Determinación de proteínas en el preparado enzimático comercial.**

Se determinó la cantidad de proteína en el preparado enzimático comercial según el método Bradford,<sup>573</sup> siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.3.1.1.1.

- **Determinación de la actividad enzimática de  $\beta$ -galactosidasa recombinante de *Bacillus circulans*  $\beta$ -gal-3 ATCC 31382.**

Se determino la actividad enzimática del preparado enzimático según el método que aparece descrito en el apartado 6.3.1.1.1 substituyendo la disolución tampón Tris/HCl 10 mM pH 7.3, por una disolución tampón fosfato sódico 50 mM pH 6.

#### **6.3.1.3.2. Procedimiento de inmovilización-estabilización de $\beta$ -galactosidasa recombinante de *Bacillus circulans* $\beta$ -gal-3 ATCC 31382.**

Se llevo a cabo la inmovilización-estabilización de la  $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans* cepa americana siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.3.1.1.2 substituyendo la disolución tampón Tris/HCl 10 mM pH 7.3, 500 mM en NaCl por una disolución tampón fosfato sódico 50 mM pH 6, 500 mM en NaCl.

#### **6.3.1.3.3. Caracterización del derivado inmovilizado de $\beta$ -galactosidasa recombinante de *Bacillus circulans* $\beta$ -gal-3 ATCC 31382.**

- **Determinación de la cantidad de proteína inmovilizada en los soportes.**

Se determino según el método Bradford,<sup>573</sup> siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.3.1.1.3.



- **Determinación de la actividad enzimática de los derivados inmovilizados.**

Se determino la cantidad de PNF liberado en el medio de reacción mediante espectroscopia UV/vis a 410 nm, en la reacción de hidrólisis enzimática de *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.3.1.1.3 sustituyendo la disolución tampón Tris/HCl 10 mM pH 7.3, por una disolución tampón fosfato sódico 50 mM pH 6.

#### **6.3.1.4. Inmovilización-estabilización de $\beta$ -galactosidasa de *Thermus thermophilus* TTP0042.**

##### **6.3.1.4.1. Caracterización de $\beta$ -galactosidasa de *Thermus thermophilus* TTP0042.**

- **Determinación de proteínas en el preparado enzimático comercial.**

Se determinó la cantidad de proteína en el preparado enzimático comercial según el método Bradford,<sup>573</sup> siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.3.1.1.1.

- **Determinación de la actividad enzimática de  $\beta$ -galactosidasa de *Thermus thermophilus* TTP0042.**

Se determino la actividad enzimática del preparado enzimático según el método que aparece descrito en el apartado 6.3.1.1.1 sustituyendo la disolución tampón Tris/HCl 10 mM pH 7.3, por una disolución tampón fosfato sódico 50 mM pH 7 y llevando a cabo la reacción a 80°C en vez de a 37°C.

##### **6.3.1.4.2. Procedimiento de inmovilización-estabilización de $\beta$ -galactosidasa de *Thermus thermophilus* TTP0042.**

Se llevo a cabo la inmovilización-estabilización de la  $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans* cepa americana siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.3.1.1.2 sustituyendo la disolución tampón Tris/HCl 10 mM pH 7.3, 500 mM en NaCl por una disolución tampón fosfato sódico 50 mM pH 7, 500 mM en NaCl.

##### **6.3.1.4.3. Caracterización del derivado inmovilizado de $\beta$ -galactosidasa de *Thermus thermophilus* TTP0042.**

- **Determinación de la cantidad de proteína inmovilizada en los soportes.**

Se determino según el método Bradford,<sup>573</sup> siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.3.1.1.3.

- **Determinación de la actividad enzimática de los derivados inmovilizados.**

Se determinó la cantidad de PNF liberado en el medio de reacción mediante espectroscopia UV/vis a 410 nm, en la reacción de hidrólisis enzimática de *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.3.1.1.3 substituyendo la disolución tampón Tris/HCl 10 mM pH 7.3, por una disolución tampón fosfato sódico 50 mM pH 7 y llevando a cabo la reacción a 80°C en vez de a 37°C.

### 6.3.2. Inmovilización-estabilización de Lipasas.

#### 6.3.2.1. Inmovilización-estabilización de lipasa de *Pseudomonas fluorescens*.

##### 6.3.2.1.1. Caracterización de lipasa de *Pseudomonas fluorescens*.

- **Determinación de proteínas en el preparado enzimático comercial.**

Se determinó la cantidad de proteína en el preparado enzimático comercial según el método Bradford,<sup>573</sup> siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.3.1.1.1.

- **Determinación de la actividad enzimática de lipasa de *Pseudomonas fluorescens* libre.**

Se determinó la cantidad de PNF liberado en el medio de reacción mediante espectroscopia UV/vis a 410 nm para un pH de 7.0, en la reacción de hidrólisis enzimática del *p*-nitrofenil-palmitato. La reacción se realizó añadiendo a una cubeta de cuarzo, de 1 cm de espesor, 1400  $\mu$ l de tampón fosfato sódico 50 mM pH 7.0, 250  $\mu$ l de una solución 10 mM *p*-nitrofenil-palmitato preparada en isopropanol y posteriormente se añadieron 600  $\mu$ l de una disolución enzimática 0.5 mg/mL, siguiéndose la reacción durante 1 minutos.

El PNF liberado se cuantifica espectrofotométricamente mediante extrapolación del dato de absorbancia en la recta de calibrado realizada previamente para un pH de 7.0. La velocidad inicial se calculó en  $\mu$ moles de PNF liberado por minuto. En todos los casos las experiencias se realizaron por triplicado y el resultado final se indicó como la media aritmética de los tres valores obtenidos con un error máximo del 5%.

##### 6.3.2.1.2. Procedimiento de inmovilización-estabilización lipasa de *Pseudomonas fluorescens*.

En primer lugar se llevó a cabo un screening para seleccionar el mejor polímero (el que presenta mayor carga enzimática y mayor actividad catalítica), para la inmovilización de la lipasa de *Pseudomonas fluorescens*.

- **Procedimiento de inmovilización para la selección del polímero.**

En tubos de plástico de 2.5 mL, con tapón de rosca, se pesaron 20 mg de cada polímero sintetizado y se añadieron 2 mL de una disolución de preparado enzimático comercial 8.5

mg/mL (0.1 mg enzima/mL, 611 U mg<sup>-1</sup>), preparada con una solución tampón fosfato sódico 50 mM pH 7.0, la mezcla se agitó hasta homogenización, y se tomó una alícuota para determinar la cantidad de enzima y actividad inicial. A continuación, se siguió en procedimiento descrito en el apartado 6.3.1.1.2.

- **Optimización de la carga enzimática del derivado inmovilizado.**

En dos tubos de plástico de 2.5 mL, con tapón de rosca, se pesaron en cada uno 20 mg poli(GMA-co-HDDMA)-2 y se añadieron en uno 2 mL de una disolución de preparado enzimático comercial 17 mg/mL (0.2 mg enzima/mL, 611 U mg<sup>-1</sup>), preparada con una solución tampón fosfato sódico 50 mM pH 7.0, y en el otro 2 mL de una disolución de preparado enzimático comercial 25.5 mg/mL (0.3 mg enzima/mL, 611 U mg<sup>-1</sup>), preparada con una solución tampón fosfato sódico 50 mM pH 7.0. La mezcla se agitó hasta homogenización, y se tomó una alícuota para determinar la cantidad de enzima y actividad inicial. A continuación, se siguió en procedimiento descrito en el apartado 6.3.1.1.2.

Posteriormente se preparó en grandes cantidades el mejor derivado seleccionado en el apartado anterior.

- **Procedimiento de inmovilización para obtener la cantidad del derivado inmovilizado necesaria para llevar a cabo la aplicación sintética.**

En un matraz erlenmeyer de 250 mL, se pesaron 3333 mg de preparado enzimático (40 mg de enzima, 611 U mg<sup>-1</sup>), se añadieron 100 mL de disolución tampón fosfato sódico 50 mM pH 7.0, la mezcla se agitó hasta su disolución, y se tomó una alícuota para determinar la cantidad de enzima y actividad inicial. Se añadieron 2 gramos de poli(GMA-co-HDDMA)-2 y a continuación se siguió en procedimiento descrito en el apartado 6.3.1.1.2.

### 6.3.2.1.3. Caracterización del derivado inmovilizado de lipasa de *Pseudomonas fluorescens*.

- **Determinación de la cantidad de proteína inmovilizada en los soportes.**

Se determinó la cantidad de enzima inmovilizada en los polímeros por el método Bradford,<sup>573</sup> siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.3.1.1.3.

- **Determinación de la actividad enzimática de los derivados inmovilizados.**

Se determinó la cantidad de PNF liberado en el medio de reacción mediante espectroscopia UV/vis a 410 nm, en la reacción de hidrólisis enzimática de *p*-nitrofenilpalmitato. La reacción se realizó añadiendo a la cubeta de cuarzo, de 1 cm de espesor, dotada de un sistema de agitación magnético, 2000 µL de tampón fosfato sódico 50 mM pH 7.0 y 2 mg de

derivado inmovilizado. Posteriormente se añadieron 250  $\mu$ l de una disolución 10 mM *p*-nitrofenil-palmitato preparada en isopropanol, siguiéndose la reacción durante 1 minuto.

El PNF liberado se cuantifica espectrofotométricamente mediante extrapolación de los valores de absorbancia en la recta de calibrado realizada previamente para un pH de 7.0. La velocidad inicial se calculo en  $\mu$ moles de PNF liberado por minuto. En todos los casos las experiencias se realizaron por triplicado y el resultado final se indicó como la media aritmética de los tres valores obtenidos con un error máximo del 5%.

- **Efecto del pH en la actividad catalítica de los derivados inmovilizados.**

Utilizando el mejor derivado inmovilizado de la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* preparado en el apartado 6.3.2.1.2 se llevo a cabo el estudio del efecto del pH en la actividad catalítica del derivado inmovilizado en las condiciones descritas en el apartado 6.3.2.1.1 para el enzima libre y 6.3.2.1.3 para el derivado inmovilizado. Estos experimentos se llevaron a cabo con las siguientes disoluciones tampón a diferentes pH. Estos experimentos se llevaron a cabo con las siguientes disoluciones tampón a diferentes pH:

- Tampón citrato/fosfato 50 mM: pH 5.0, 5.5.
- Tampón fosfato sódico 50 mM: pH 6.0, 6.5, 7.0.
- Tampón Tris/HCl 50 mM: pH 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5.

- **Estabilidad térmica de los derivados inmovilizados.**

Se analizó la estabilidad térmica de la enzima libre y la enzima inmovilizada sobre poli(GMA-*co*-HDDMA)-2 a 37°C y 50°C. Para este estudio se analizó la actividad enzimática de ambos preparados enzimáticos (enzima libre y enzima inmovilizada, 0.01 mg/mL) sometido a calentamiento (37°C y 50°C) a los tiempos 0h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h, 12h, 24h, 36h y 48h.

La determinación de la actividad enzimática se llevó a cabo en las condiciones descritas en el apartado 6.3.2.1.3.

### **6.3.2.2. Inmovilización-estabilización de lipasa de *Pseudomonas cepacia*.**

#### **6.3.2.2.1. Caracterización de lipasa de *Pseudomonas cepacia*.**

- **Determinación de proteínas en el preparado enzimático comercial.**

Se determinó la cantidad de proteína en el preparado enzimático comercial según el método Bradford,<sup>573</sup> siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.3.1.1.

- **Determinación de la actividad enzimática de lipasa de *Pseudomonas cepacia* libre.**

Se determinó de la actividad enzimática de lipasa de *Pseudomonas cepacia* siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.3.2.1.1.

### 6.3.2.2.2. Procedimiento de inmovilización-estabilización lipasa de *Pseudomonas cepacia*.

En primer lugar se llevó a cabo un screening para seleccionar el mejor polímero (el que presenta mayor carga enzimática y mayor actividad catalítica), para la inmovilización de la lipasa de *Pseudomonas cepacia*.

- **Procedimiento de inmovilización para la selección del polímero.**

En tubos de plástico de 2.5 mL, con tapón de rosca, se pesaron 20 mg de cada polímero sintetizado y se añadieron 2 mL de una disolución de preparado enzimático comercial 6.7 mg/mL (0.1 mg enzima/mL, 232 U mg<sup>-1</sup>), preparada con una solución tampón fosfato sódico 50 mM pH 7.0, la mezcla se agitó hasta homogenización, y se tomó una alícuota para determinar la cantidad de enzima y actividad inicial. A continuación, se siguió en procedimiento descrito en el apartado 6.3.2.1.2.

- **Optimización de la carga enzimática del derivado inmovilizado.**

En dos tubos de plástico de 2.5 mL, con tapón de rosca, se pesaron en cada uno 20 mg poli(BGMPME-co-DVB)-5 y se añadieron en uno 2 mL de una disolución de preparado enzimático comercial 13.3 mg/mL (0.2 mg enzima/mL, 232 U mg<sup>-1</sup>), preparada con una solución tampón fosfato sódico 50 mM pH 7.0, y en el otro 2 mL de una disolución de preparado enzimático comercial 20 mg/mL (0.3 mg enzima/mL, 232 U mg<sup>-1</sup>), preparada con una solución tampón fosfato sódico 50 mM pH 7.0. La mezcla se agitó hasta homogenización, y se tomó una alícuota para determinar la cantidad de enzima y actividad inicial. A continuación, se siguió en procedimiento descrito en el apartado 6.3.2.1.2.

- **Procedimiento de inmovilización para obtener la cantidad del derivado inmovilizado necesaria para llevar a cabo la aplicación sintética.**

En un matraz erlenmeyer de 250 mL, se pesaron 2667 mg de preparado enzimático (40 mg de enzima, 232 U mg<sup>-1</sup>), se añadieron 100 mL de disolución tampón fosfato sódico 50 mM pH 7.0, la mezcla se agitó hasta su disolución, y se tomó una alícuota para determinar la cantidad de enzima y actividad inicial. Se añadieron 2 gramos de poli(BGMPME-co-DVB)-5 y a continuación se siguió en procedimiento descrito en el apartado 6.3.2.1.2.

### 6.3.2.2.3. Caracterización del derivado inmovilizado de lipasa de *Pseudomonas cepacia*.

- **Determinación de la cantidad de proteína inmovilizada en los soportes.**

Se determinó la cantidad de enzima inmovilizada en los polímeros por el método Bradford,<sup>573</sup> siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.3.2.1.3.

- **Determinación de la actividad enzimática de los derivados inmovilizados.**

Se determinó la actividad enzimática de los derivados inmovilizados siguiendo el protocolo descrito en el apartado 6.3.2.1.3.

- **Efecto del pH en la actividad catalítica de los derivados inmovilizados.**

El efecto del pH en la actividad catalítica se determinó siguiendo el protocolo descrito en el apartado 6.3.2.1.3.

- **Estabilidad térmica de los derivados inmovilizados.**

Se determinó la termoestabilidad de los derivados inmovilizados siguiendo el protocolo descrito en el apartado 6.3.2.1.3.

### 6.3.2.3. Inmovilización-estabilización de lipasa de *Pseudomonas stutzeri*.

#### 6.3.2.3.1. Caracterización de lipasa de *Pseudomonas stutzeri*.

- **Determinación de proteínas en el preparado enzimático comercial.**

Se determinó la cantidad de proteína en el preparado enzimático comercial según el método Bradford,<sup>573</sup> siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.3.2.1.1.

- **Determinación de la actividad enzimática de lipasa de *Pseudomonas stutzeri* libre.**

Se determinó de la actividad enzimática de lipasa de *Pseudomonas stutzeri* siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.3.2.1.1.

#### 6.3.2.3.2. Procedimiento de inmovilización-estabilización lipasa de *Pseudomonas stutzeri*.

En primer lugar se llevó a cabo un screening para seleccionar el mejor polímero (el que presenta mayor carga enzimática y mayor actividad catalítica), para la inmovilización de la lipasa de *Pseudomonas stutzeri*.

- **Procedimiento de inmovilización para la selección del polímero.**

En tubos de plástico de 2.5 mL, con tapón de rosca, se pesaron 20 mg de cada polímero sintetizado y se añadieron 2 mL de una disolución de preparado enzimático comercial 0.63 mg/mL (0.1 mg enzima/mL, 105 U mg<sup>-1</sup>), preparada con una solución tampón fosfato sódico 50 mM pH 7.0, la mezcla se agitó hasta homogenización, y se tomó una alícuota para determinar la cantidad de enzima y actividad inicial. A continuación, se siguió en procedimiento descrito en el apartado 6.3.2.1.2.

- **Optimización de la carga enzimática del derivado inmovilizado.**

En dos tubos de plástico de 2.5 mL, con tapón de rosca, se pesaron 20 mg de poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8 y en otros dos tubos 20 mg de poli(GMA-co-HDDMA)-2. Se

añadieron en un tubo de cada polímero 2 mL de una disolución de preparado enzimático comercial 1.26 mg/mL (0.2 mg enzima/mL, 105 U mg<sup>-1</sup>), preparada con una solución tampón fosfato sódico 50 mM pH 7.0, y en el otro 2 mL de una disolución de preparado enzimático comercial 1.89 mg/mL (0.3 mg enzima/mL, 105 U mg<sup>-1</sup>), preparada con una solución tampón fosfato sódico 50 mM pH 7.0. La mezcla se agitó hasta homogenización, y se tomó una alícuota para determinar la cantidad de enzima y actividad inicial. A continuación, se siguió en procedimiento descrito en el apartado 6.3.2.1.2.

- **Procedimiento de inmovilización para obtener la cantidad del derivado inmovilizado necesaria para llevar a cabo la aplicación sintética.**

En dos matraces erlenmeyer de 250 mL, se pesaron 500 mg de preparado enzimático (40 mg de enzima, 105 U mg<sup>-1</sup>), se añadieron 100 mL de disolución tampón fosfato sódico 50 mM pH 7.0 en cada uno, la mezcla se agitó hasta su disolución, y se tomó una alícuota para determinar la cantidad de enzima y actividad inicial. Se añadieron 4 gramos de poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8 en un matraz y 4 gramos de poli(GMA-co-HDDMA)-2 en el otro. A continuación se siguió en procedimiento descrito en el apartado 6.3.2.1.2.

#### **6.3.2.3.3. Caracterización del derivado inmovilizado de lipasa de *Pseudomonas stutzeri*.**

- **Determinación de la cantidad de proteína inmovilizada en los soportes.**

Se determinó la cantidad de enzima inmovilizada en los polímeros por el método Bradford,<sup>573</sup> siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.3.2.1.3.

- **Determinación de la actividad enzimática de los derivados inmovilizados.**

Se determinó la actividad enzimática de los derivados inmovilizados siguiendo el protocolo descrito en el apartado 6.3.2.1.3.

- **Efecto del pH en la actividad catalítica de los derivados inmovilizados.**

El efecto del pH en la actividad catalítica se determinó siguiendo el protocolo descrito en el apartado 6.3.2.1.3.

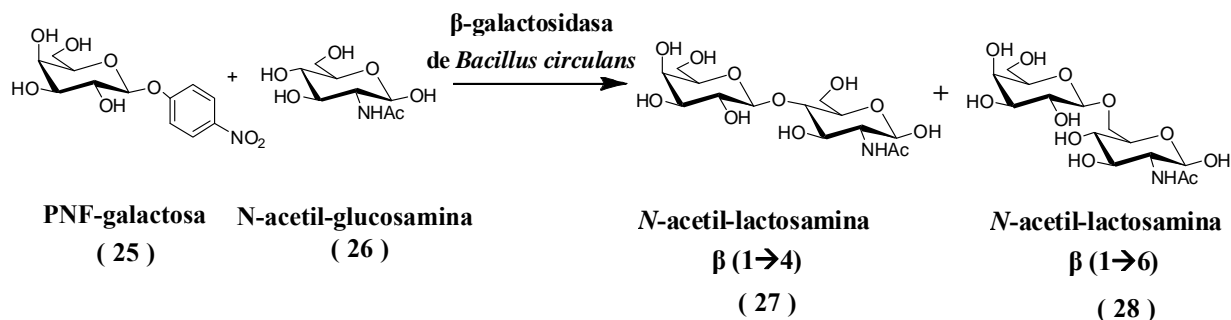
- **Estabilidad térmica de los derivados inmovilizados.**

Se determinó la termoestabilidad de los derivados inmovilizados siguiendo el protocolo descrito en el apartado 6.3.2.1.3.

## 6.4. Aplicaciones de los biocatalizadores.

### 6.4.1. Aplicaciones de las glicosidasas.

#### 6.4.1.1. Síntesis enzimática de *N*-acetil-lactosamina (Gal- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-GlcNAc) (27) con $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans*.



**Esquema 64.** Síntesis de *N*-acetil-lactosamina con  $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans* libre e inmovilizada sobre poli(AGE-co-DVB)-74.

La reacción enzimática se llevó a cabo con la enzima libre y con el mejor derivado inmovilizado obtenido en el apartado 6.3.1.1.2 (poli(AGE-co-DVB)-74).

- **Enzima libre:**

En un tubo de plástico de 2.5 mL, con tapón de rosca, se pesaron 47.6 mg de preparado enzimático comercial (4.76 mg enzima, 3.5 U mg<sup>-1</sup>), se añadieron 2 mL de una disolución 16.5mM de donador (*p*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido) y 82.5 mM de aceptor (*N*-acetil-glucosamina), ambas preparadas en una solución tampón fosfato sódico 100 mM, pH 5.8. A continuación, se colocó en un agitador tipo noria, dentro de una estufa y se agita a 37°C y 40 r.p.m. durante dos horas. Durante el transcurso de la reacción se fueron tomando alícuotas de 20  $\mu$ l que se analizaron por HPLC, tomando como referencia patrones comerciales, tanto de los reactivos como de los productos. Para ello, se realizaron diluciones 1/3 de las alícuotas con agua bidestilada y se empleó una fase móvil de acetonitrilo/agua (80/20) y un flujo de 0.8mL/min.

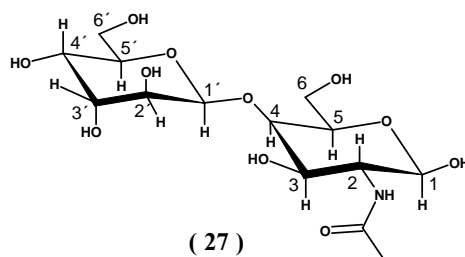
- **Enzima inmovilizada sobre poli(AGE-co-DVB)-74 :**

La reacción se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo indicado anteriormente, en este caso se pesaron 100 mg de preparado enzimático comercial (4.76 mg enzima inmovilizada, 2.9 U mg<sup>-1</sup>).

Una vez transcurrido el tiempo de reacción, la reacción se filtró a vacío sobre un embudo buchner para eliminar el derivado inmovilizado. Posteriormente el filtrado se cargó en una columna cromatográfica empleando como fase estacionaria, una mezcla carbón activo-celite 535 en porciones 11/1 (v/v), y como eluyente, primero 200 mL de agua y después un gradiente lineal de etanol de 0% a 15%.

Una vez aislado el producto, se liofilizó y se realizó su determinación estructural por espectroscopia de resonancia magnética nuclear.





**RMN-<sup>1</sup>H** 700 MHz (D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 1.93 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.44 (m, 1H, H2'), 3.49 (m, 0.43H, H5β), 3.55 (m, 1H, H3'), 3.56 (m, 0.57H, H3β), 3.61 (m, 0.43H, H2α), 3.623 (m, 1H, H5'), 3.624 (m, 0.43H, H4β), 3.65 (m, 2H, H6'), 3.72 (m, 0.86H, H6β), 3.78 (m, 1.14H, H6α), 3.79 (m, 0.57H, H2α), 3.80 (m, 0.57H, H3α), 3.81 (m, 1H, H4'), 3.86 (m, 0.57H, H4α), 3.87 (m, 1H, H5α), 4.37 (d, 1H, H1',  $J_{1',2'} = 7,84$  Hz), 4.62 (d, 0.43H, H1β,  $J_{1\beta, 2} = 8.06$  Hz), 5.10 (d, 0.57H, H1α,  $J_{1\alpha, 2} = 2.24$  Hz).

**RMN-<sup>13</sup>C**, 75.5 MHz (D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 21,80 (CH<sub>3</sub>, α), 22.10 (CH<sub>3</sub>, β), 53.65 (C-2α), 56.13 (C-2β), 59.86 (C-6α), 59.99 (C-6β), 60.96 (C-6'), 68.48 (C-4'), 69.21 (C-3α), 70.20 (C-5α), 70.90 (C-2'), 72.43 (C-3β, C-3'), 74.79 (C-5β), 75.29 (C-5'), 78.24 (C-4β), 78.68 (C-4α), 90.46 (C-1α), 94.80 (C-1β), 102.80 (C-1'β), 102.86 (C-1'α), 174.40 (C=Oα), 174.66 (C=Oβ).

La asignación de señales de estos espectros coincide con la asignación publicada con anterioridad por otro grupo de investigación.<sup>574</sup>

Para determinar la conversión de las diferentes reacciones, los productos de reacción se cuantificaron cromatográficamente mediante extrapolación de los valores de área obtenidos en una recta de calibrado realizada previamente. Para ello se prepararon disoluciones sucesivas de los productos y reactivos con la solución tampón de trabajo, como se muestra en las Tabla 147-149.

Las rectas de calibrado de los diferentes sustratos se representan en la Figuras 184-186, y se ajustaron a un modelo polinómico de primer grado según el programa estadístico POLNOM del paquete informático SIMFIT.

**Tabla 147.** Disoluciones sucesivas de galactosa para la recta de calibrado.

Patrones	Concentración (mM)
1	25
2	40,7
3	50
4	80
5	140

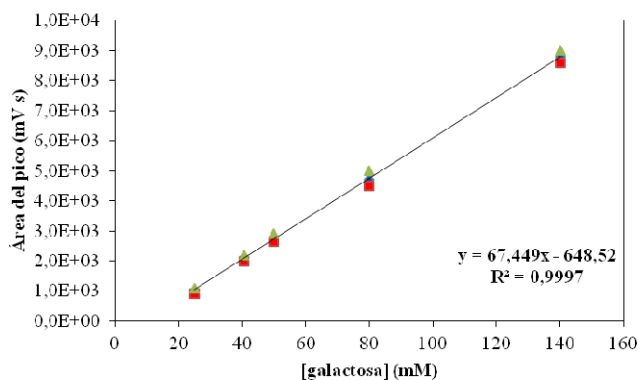


Figura 184. Recta de calibrado para la galactosa.

Tabla 148. Disoluciones sucesivas de *N*-acetil-lactosamina (Gal-β-(1→4)-GlcNAc) para la recta de calibrado.

Patrones	Concentración (mM)
1	0,7
2	1,14
3	1,55
4	4,0
5	7,0
6	10,0

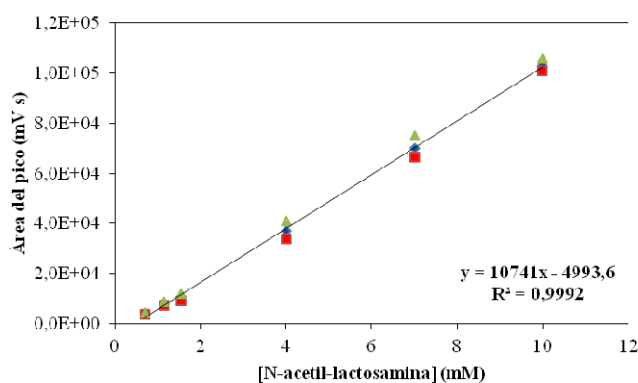


Figura 185. Recta de calibrado para la *N*-acetil-lactosamina (Gal-β 1→4-GlcNAc).

Tabla 149. Disoluciones sucesivas de producto (Galβ 1→6GlcNAc) para la recta de calibrado.

Patrones	Concentración (mM)
1	1,0
2	1,23
3	2,0
4	2,5
5	5,0
6	7,5
7	10,0

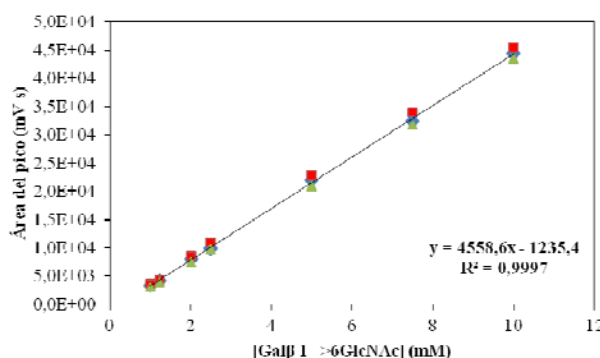


Figura 186. Recta de calibrado para la producto (Galβ 1→6GlcNAc).

#### 6.4.1.1.1. Síntesis enzimática de *N*-acetil-lactosamina (Gal-β 1→4-GlcNAc) (27) en presencia de disolventes sostenibles.

- **Disolventes provenientes de biomasa.**

Este estudio se realizó con tres disolventes verdes diferentes: DMA1, GC7 y GC8.

La reacción se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo indicado anteriormente (apartado 6.4.1.1), en este caso se pesaron 50 mg de preparado enzimático comercial (2.38 mg enzima inmovilizada, 2.9 U mg<sup>-1</sup>). En este caso el medio de reacción consistió en una solución tampón fosfato sódico 100 mM, pH 5.8, 2mM disolvente sostenible.

- **Líquidos iónicos.**

Este estudio se realizó con cuatro líquidos iónicos diferentes: [Troma] [Tf<sub>2</sub>N], [Bmin] [PF<sub>6</sub>], [Bmin] [PAF] y [Emin] [BF<sub>4</sub>].

La reacción se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo indicado en el apartado 6.4.1.1., en este caso se pesaron 50 mg de preparado enzimático comercial (2.38 mg enzima inmovilizada, 2.9 U mg<sup>-1</sup>). En este caso el medio de reacción consistió en una solución tampón fosfato sódico 100 mM, pH 5.8, 30% en líquido iónico.

#### 6.4.1.1.2. Reutilización de la β-galactosidasa de *B. circulans* inmovilizada sobre poli(AGE-co-DVB)-74 en la síntesis de *N*-acetil-lactosamina (Gal-β 1→4-GlcNAc) (27).

- **Reusos en disolución tampón fosfato sódico.**

La reacción se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo indicado anteriormente (apartado 6.4.1.1), en este caso se pesaron 100 mg de preparado enzimático comercial (4.76 mg enzima inmovilizada, 2.9 U mg<sup>-1</sup>). Posteriormente la reacción se filtró a vacío en un embudo buchner para retirar el derivado inmovilizado y el este se lavó con 10 mL de disolución tampón fosfato sódico 100mM. Una vez lavado, el derivado inmovilizado se coloca en un tubo de plástico de 2.5 mL, con tapón de rosca, y se repite el ciclo de reacción. Estas reacciones de reutilización se repitieron 20 veces con el mismo derivado inmovilizado.

- **Reusos en presencia de disolventes provenientes de biomasa.**

Este estudio se realizó con tres disolventes verdes diferentes: DMA1, GC7 y GC8.

La reacción se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo indicado en el apartado 6.4.1.1., en este caso se pesaron 100 mg de preparado enzimático comercial (4.76 mg enzima inmovilizada, 2.9 U mg<sup>-1</sup>) y el medio de reacción consistió en una solución tampón fosfato sódico 100 mM, pH 5.8, 2mM disolvente sostenible. Posteriormente la reacción se filtró a vacío en un embudo buchner para retirar el derivado inmovilizado y el este se lavó con 10 mL de disolución tampón fosfato sódico 100 mM. Una vez lavado, el derivado inmovilizado se coloca en un tubo de plástico de 2.5 mL, con tapón de rosca, y se repite el ciclo de reacción.

Estas reacciones de reutilización se repitieron 20 veces con el mismo derivado inmovilizado.

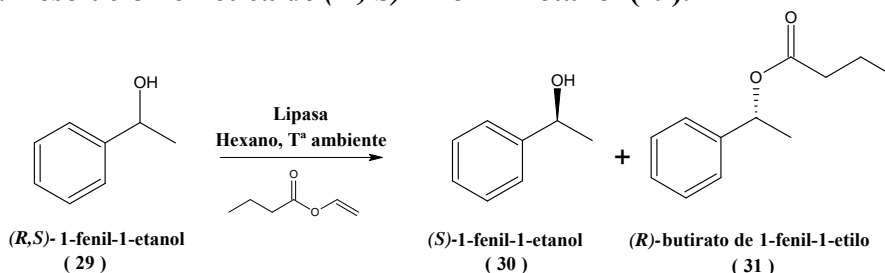
- **Reusos en presencia de líquidos iónicos.**

Este estudio se realizó con cuatro líquidos iónicos diferentes: [Troma] [Tf<sub>2</sub>N], [Bmin] [PF<sub>6</sub>], [Bmin] [PAF] y [Emin] [BF<sub>4</sub>]. La reacción se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo anteriormente, en este caso se pesaron 100 mg de preparado enzimático comercial (4.76 mg enzima inmovilizada, 2.9 U mg<sup>-1</sup>) y el medio de reacción consistió en una solución tampón fosfato sódico 100 mM, pH 5.8, 30% de líquido iónico. Posteriormente la reacción se filtró a vacío en un embudo buchner para retirar el derivado inmovilizado y el este se lavó con 10 mL de disolución tampón fosfato sódico 100 mM. En este caso tras los lavados se observó que no se eliminaba el líquido iónico del derivado inmovilizado, por lo que no se pudieron realizar ciclos de reutilización.

## 6.4.2. Aplicaciones de las lipasas.

### 6.4.2.1. Resoluciones cinéticas.

#### 6.4.2.1.1. Resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol (29).



Esquema 65. Resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol catalizada por lipasas.

#### 6.4.2.1.1.1. Resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol (29) con lipasa de *Pseudomonas fluorescens*.

En viales de vidrio de 10 mL, con tapón, se pesaron 21 mg de preparado enzimático (0.25 mg de enzima, 611Umg<sup>-1</sup>), para la enzima libre, y 10 mg del derivado inmovilizado poli(GMA-co-HDDMA)-2 (0.12 mg de enzima, 519Umg<sup>-1</sup>), para la enzima inmovilizada. A continuación

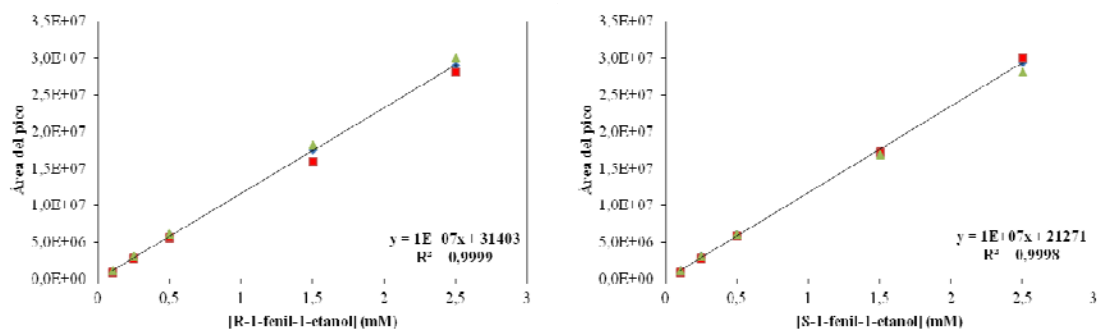
se añadieron a cada vial, 1.5 mL de hexano (HPLC), 0.4 mmol de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol (48  $\mu$ l) y 1.2 mmol de butirato de vinilo (152  $\mu$ l). Se agitaron las mezclas de reacción a temperatura ambiente, 200 r.p.m. durante 4 horas. Para analizar el progreso de la reacción, se tomaron alícuotas de 40  $\mu$ l a diferentes tiempos de reacción (0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420 y 480 minutos), se añadieron sobre 200  $\mu$ l hexano/2-propanol (50/50, (v/v)). Estas soluciones se filtraron a través de filtros Miles®-GV, PVDF de tamaño de poro de 0.22  $\mu$ m con el fin de eliminar posibles restos de enzima y de derivado inmovilizado que puedan dañar la columna quiral de HPLC. Cada muestra fue analizada mediante HPLC (*n*-hexano: 2-propanol, 90:10; Flujo 0.8 mL/min; columna quiral Chiralcel OD®,  $\lambda_{\text{max.}} = 246$  nm).

Para determinar la conversión de las diferentes reacciones, los productos de reacción se cuantificaron cromatográficamente mediante extrapolación de los valores de área obtenidos en una recta de calibrado realizada previamente.

Para ello se prepararon disoluciones sucesivas de los dos enantiómeros del reactivo de partida, como se muestra en la Tabla 150. Las rectas de calibrado del reactivo de partida se representan en la Figura 187 y se ajustó a un modelo polinómico de primer grado según el programa estadístico POLNOM del paquete informático SIMFIT.

**Tabla 150.** Disoluciones sucesivas de 1-fenil-1-etanol para la recta de calibrado.

Patrones	Concentración (mM)
1	0,1
2	0,25
3	0,5
4	1,5
5	2,5



**Figura 187.** Rectas de calibrado para el 1-fenil-1-etanol.

#### 6.4.2.1.1.1. Resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol (29) con la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* en presencia de disolventes sostenibles.

- **Disolventes provenientes de biomasa.**

En este caso, se sustituyeron los disolventes derivados de biomasa empleados con la  $\beta$ -galactosidasa de *B. circulans* (1-isopropoxi-3-(2,2,2-trifluoroetoxi)propan-2-ol (GC7), 1,3-

bis(2,2,2-trifluoroetoxi) propan-2-ol (GC8) y 2-hidroxi-*N,N*-dimetilpropanamida (DMA1)), que poseían grupos funcionales alcohol libres que podían interferir en el proceso de resolución cinética de alcoholes secundarios, por otros que no tuvieran alcoholes libre: 2-metoxi-1,3-bis(2,2,2-trifluoroetoxi)propano (GC9), 1-(3-butoxi-2-metoxipropoxi) butano (GC12), *N,N*-dimetilhexanamida (DMA3), *N,N*-dimetil octanamida (DMA4), *N,N*-dimetildecanamida (DMA5), *N,N*-dimetildodecanamida (DMA6). Este estudio se llevó a cabo siguiendo el procedimiento experimental descrito anteriormente en el apartado 6.4.2.1.1.1, sustituyendo el disolvente empleado en la resolución cinética (*n*-hexano), por mezclas de hexano 2 mM en disolvente sostenible proveniente de biomasa.

- **Líquidos iónicos.**

Este estudio se realizó con tres líquidos iónicos asequibles comercialmente que han sido empleados previamente por otros grupos de investigación: [Bmin] [PF<sub>6</sub>], [Emin] [BF<sub>4</sub>] y [Bmin] [PAF].<sup>448, 546-549</sup> Este estudio se llevó a cabo siguiendo el procedimiento experimental descrito anteriormente en el apartado 6.4.2.1.1.1, sustituyendo el disolvente empleado en la resolución cinética (*n*-hexano), por mezclas de hexano al 30% en líquido iónico.

#### 6.4.2.1.1.1.2. Reutilización de la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* inmovilizada sobre poli(GMA-*co*-HDDMA)-2 en la resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol (29).

- **Reutilización en hexano:**

En viales de vidrio de 10 mL, con tapón, se pesaron 10 mg del derivado inmovilizado poli(GMA-*co*-HDDMA)-2 (0.12 mg de enzima, 519Umg<sup>-1</sup>). A continuación se añadieron a cada vial, 1.5 mL de hexano (HPLC), 0.4 mmol de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol (48 µl) y 1.2 mmol de butirato de vinilo (152 µl). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente a 200 r.p.m. Para realizar el seguimiento de la reacción se tomaron alícuotas de 40 µl a diferentes tiempos, se añadieron sobre 200 µl hexano/2-propanol (50/50, (v/v) y se analizaron mediante HPLC (*n*-hexano: 2-propanol, 90:10; Flujo 0.8 mL/min; columna quiral Chiralcel OD<sup>®</sup>, λ<sub>max</sub> = 246 nm). Una vez completada la reacción, el derivado inmovilizado se filtró en un embudo buchner, se lavo con 5 mL de hexano, se deja secar al aire sobre papel de filtro y se repite el proceso descrito anteriormente. Estas reacciones de reutilización se repitieron 30 veces con el mismo derivado inmovilizado.

- **Reutilización en disolventes sostenibles provenientes de biomasa.**

Este estudio se realizó con 6 disolventes sostenibles diferentes provenientes de biomasa: GC9, GC12, DMA3, DMA4, DMA5 y DMA6, y se llevó a cabo repitiendo el procedimiento anterior sustituyendo en disolvente (*n*-hexano) por mezclas hexano 2 mM en disolvente sostenible.

- **Reutilización en líquidos iónicos.**

Este estudio se realizó con tres líquidos iónicos diferentes: [Bmin] [PF<sub>6</sub>], [Bmin] [PAF] y [Emin] [BF<sub>4</sub>], y se llevó a cabo repitiendo el procedimiento que en la reutilización en hexano substituyendo en disolvente (*n*-hexano) por hexano al 30 % el líquido iónico.

Con los líquidos iónicos (LIs) no se pudo realizar el estudio de reusabilidad debido a que los LIs quedaron atrapados en el derivado inmovilizado y no pudieron ser eliminados tras los lavados llevados a cabo con hexano.

#### **6.4.2.1.1.2. Resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol (29) con lipasa de *Pseudomonas cepacia*.**

En viales de vidrio de 10 mL, con tapón, se pesaron 34 mg de preparado enzimático (0.50 mg de enzima, 232Umg<sup>-1</sup>), para la enzima libre, y 10 mg del derivado inmovilizado poli(BGMPME-*co*-DVB)-5 (0.18 mg de enzima, 200Umg<sup>-1</sup>), para la enzima inmovilizada. A continuación se repitió el procedimiento descrito en el apartado 6.4.2.1.1.1.

##### **6.4.2.1.1.2.1. Resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol (29) con la lipasa de *Pseudomonas cepacia* en presencia de disolventes sostenibles.**

Este estudio se llevó a cabo siguiendo el procedimiento experimental descrito anteriormente en el apartado 6.4.2.1.1.1.1, empleando 34 mg de preparado enzimático (0.50 mg de enzima, 232Umg<sup>-1</sup>) para la enzima libre, y 10 mg del derivado inmovilizado poli(BGMPME-*co*-DVB)-5 (0.18 mg de enzima, 200Umg<sup>-1</sup>).

##### **6.4.2.1.1.2.2. Reutilización de la lipasa de *Pseudomonas cepacia* inmovilizada sobre poli(BGMPME-*co*-DVB)-5 en la resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol (29).**

Este estudio se llevó a cabo con 68 mg del derivado inmovilizado poli(BGMPME-*co*-DVB)-5 (0.36 mg de enzima, 200Umg<sup>-1</sup>) repitiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.4.2.1.1.1.2, empleando 34 mg de preparado enzimático (0.50 mg de enzima, 232Umg<sup>-1</sup>) para la enzima libre, y 10 mg del derivado inmovilizado poli(BGMPME-*co*-DVB)-5 (0.18 mg de enzima, 200Umg<sup>-1</sup>).

##### **6.4.2.1.1.3. Resolución cinética de (*R,S*)-1-fenil-1-etanol (29) con lipasa de *Pseudomonas stutzeri*.**

En viales de vidrio de 10 mL, con tapón, se pesaron 1 mg de preparado enzimático (0.16 mg de enzima, 105Umg<sup>-1</sup>), para la enzima libre, y 10 mg del derivado inmovilizado poli(BGMPMA-*co*-EGDMA)-8 (0.17 mg de enzima, 87Umg<sup>-1</sup>), para la enzima inmovilizada. A continuación se repite el procedimiento descrito en el apartado 6.4.2.1.1.1.

#### 6.4.2.1.1.3.1. Resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-1-etanol (29) con la lipasa de *Pseudomonas stutzeri* en presencia de disolventes sostenibles.

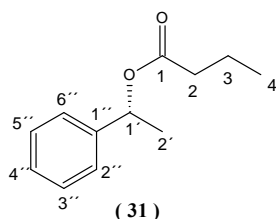
Este estudio se llevó a cabo siguiendo el procedimiento experimental descrito anteriormente en el apartado 6.4.2.1.1.1.1, empleando 1 mg de preparado enzimático (0.16 mg de enzima, 105Umg<sup>-1</sup>), para la enzima libre, y 10 mg del derivado inmovilizado poli(BGMPMA-*co*-EGDMA)-8 (0.17 mg de enzima, 87Umg<sup>-1</sup>).

#### 6.4.2.1.1.3.2. Reutilización de la lipasa de *Pseudomonas stutzeri* inmovilizada sobre poli(BGMPMA-*co*-EGDMA)-8 en la resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-1-etanol (29).

Este estudio se llevó a cabo con 15 mg del derivado inmovilizado poli(BGMPMA-*co*-EGDMA)-8 (0.25 mg de enzima, 87Umg<sup>-1</sup>) repitiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.4.2.1.1.1.2, empleando 1 mg de preparado enzimático (0.16 mg de enzima, 105Umg<sup>-1</sup>), para la enzima libre, y 10 mg del derivado inmovilizado poli(BGMPMA-*co*-EGDMA)-8 (0.17 mg de enzima, 87Umg<sup>-1</sup>).

#### 6.4.2.1.1.4. Caracterización del producto (*R*)-butirato de 1-fenil-1-etilo (31).

Una vez transcurrido el tiempo de reacción, la reacción se filtra a vacío sobre un embudo buchner y con el filtrado se realiza una columna cromatográfica empleando como fase estacionaria, sílica gel, y como fase móvil hexano/acetato de etilo, 5/1 (v/v). Una vez aislado el producto, se realizó su determinación estructural mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear y la medida del poder óptico rotatorio del producto.



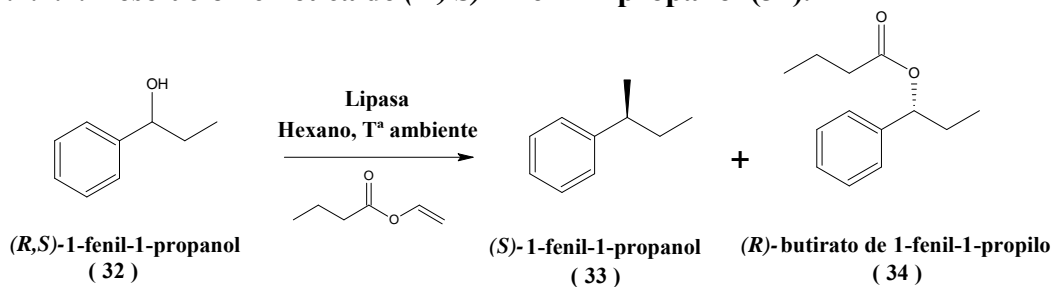
**RMN-<sup>1</sup>H**, 300 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 0.91 (t, J<sub>4,3</sub>: 7.44Hz, 3H, H-4), 1.51 (d, J<sub>2',1'</sub>: 6.68Hz, 3H, H-2'), 1.64 (m, <sup>3</sup>J<sub>3,4;3,2</sub>: 7.40Hz, 2H, H-3), 2.29 (t, J<sub>2,3</sub>: 7.63Hz, 2H, H-2), 5.90 (q, J<sub>1',2'</sub>: 6.68Hz, 1H, H-1'), 7.22-7.35 (m, 5H, H-2'', 3'', 4'', 5'', 6'').

**RMN-<sup>13</sup>C**, 75.5 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 13.47 (C-4), 22.12 (C-2'); 36.34 (C-2), 71.84 (C-1'), 125.89 (C-2'', C-6''), 127.61 (C-4''), 128.30 (C-3'', C-5''), 141.74 (C-1''), 172.65 (C-1).

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: + 92.5 (CHCl<sub>3</sub>).



### 6.4.2.1.2. Resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-1-propanol (32).



Esquema 66. Resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-1-propanol catalizada por lipasas.

#### 6.4.2.1.2.1. Resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-1-propanol (32) con lipasa de *Pseudomonas fluorescens*.

En viales de vidrio de 10 mL, con tapón, se pesaron 33 mg de preparado enzimático (0.4 mg de enzima, 611Umg<sup>-1</sup>), para la enzima libre, y 20 mg del derivado inmovilizado poli (GMA-*co*-HDDMA)-2 (0.24 mg de enzima, 519Umg<sup>-1</sup>), para la enzima inmovilizada. Se añadió a cada vial 1.5 mL de hexano (HPLC), 0.4 mmol de (*R*, *S*)-1-fenil-1-propanol (55  $\mu$ l) y 1.2 mmol de butirato de vinilo (152  $\mu$ l). A continuación se repitió el procedimiento descrito en el apartado 6.4.2.1.1.1.

Para determinar la conversión de las diferentes reacciones, los productos de reacción se cuantificaron cromatográficamente mediante extrapolación de los valores de área obtenidos en una recta de calibrado realizada previamente.

Para ello se prepararon disoluciones sucesivas de los dos enantiómeros del reactivo de partida, como se muestra en la Tabla 151. Las rectas de calibrado del reactivo de partida se representan en la Figura 188 y se ajustó a un modelo polinómico de primer grado según el programa estadístico POLNOM del paquete informático SIMFIT.

Tabla 151. Disoluciones sucesivas de 1-fenil-1-propanol para la recta de calibrado.

Patrones	Concentración (mM)
1	0,1
2	0,25
3	0,5
4	1,5
5	2,5

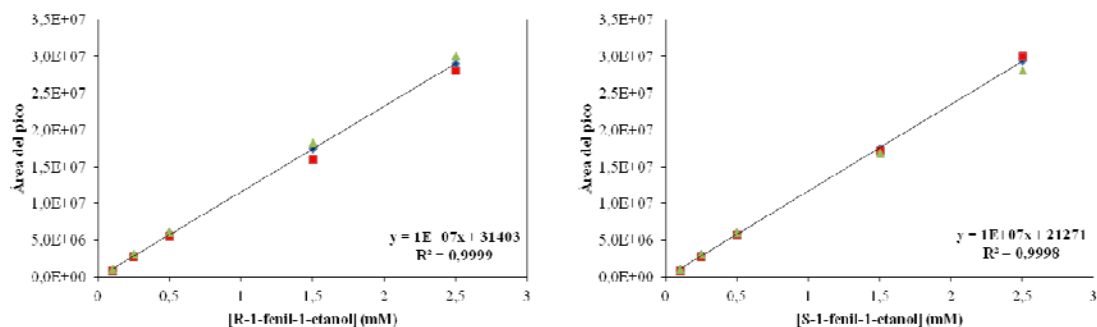


Figura 188. Rectas de calibrado para el 1-fenil-1-propanol.

#### 6.4.2.1.2.2. Resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-1-propanol (32) con lipasa de *Pseudomonas cepacia*.

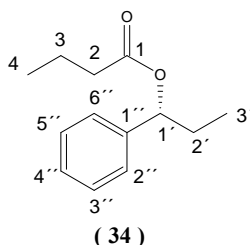
Este estudio se llevo a cabo empleando 80 mg de preparado enzimático (1.2 mg de enzima, 232Umg<sup>-1</sup>) para la enzima libre, y 30 mg del derivado inmovilizado poli(BGMPME-co-DVB)-5 (0.54 mg de enzima, 200Umg<sup>-1</sup>), siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.4.2.1.2.1

#### 6.4.2.1.2.3. Resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-1-propanol (32) con lipasa de *Pseudomonas stutzeri*.

Este estudio se llevo a cabo empleando 5 mg de preparado enzimático (0.8 mg de enzima, 105Umg<sup>-1</sup>) para la enzima libre, y 48 mg del derivado inmovilizado poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8 (0.8 mg de enzima, 87Umg<sup>-1</sup>), siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.4.2.1.2.1

#### 6.4.2.1.2.4. Caracterización del producto (*R*)-butirato de 1-fenil-1-propilo (34).

Una vez transcurrido el tiempo de reacción, la reacción se filtra a vacío sobre un embudo buchner y con el filtrado se realiza una columna cromatográfica empleando como fase estacionaria, sílica gel, y como fase móvil hexano/acetato de etilo, 5/1 (v/v). Una vez aislado el producto, se realizó su determinación estructural mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear y la medida del poder óptico rotatorio del producto

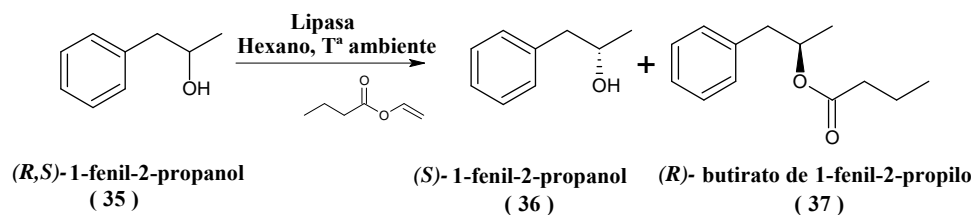


**RMN-<sup>1</sup>H**, 300 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 0.81 (t, J<sub>3', 2'</sub>: 7.25Hz, 3H, H-3'), 0.86 (t, J<sub>4, 3</sub>: 7.44Hz, 3H, H-4), 1.59 (m, J<sub>3, 4; 3, 2</sub>: 7.40Hz, 2H, H-3), 1.80 (m, 2H, H-2'), 2.25 (td, J<sub>2, 3</sub>: 7.44Hz, J<sub>2, 2'</sub>: 1.14Hz, 2H, H-2), 5.62 (m, J: 7.25Hz, J: 6.49Hz, 1H, H-1'), 7.17-7.30 (m, 5H, H-2'', 3'', 4'', 5'', 6'').

**RMN-<sup>13</sup>C**, 75.5 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 9.86 (C-3'), 13.60 (C-4), 18.46 (C-3), 29.34 (C-2'), 36.46 (C-2), 77.0 (C-1') 126.46 (C-2'', C-6''), 127.67 (C-4''), 128.29 (C-3'', C-5''), 140.71 (C-1''), 172.94 (C-1).

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: +92.3 (CHCl<sub>3</sub>)

### 6.4.2.1.3. Resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-2-propanol (35).



Esquema 67. Resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-2-propanol catalizada por lipasas.

#### 6.4.2.1.3.1. Resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-2-propanol (35) con lipasa de *Pseudomonas fluorescens*.

En viales de vidrio de 10 mL, con tapón, se pesaron 17 mg de preparado enzimático (0.2 mg de enzima, 611Umg<sup>-1</sup>), para la enzima libre, y 10 mg del derivado inmovilizado poli(GMA-co-HDDMA)-2 (0.12 mg de enzima, 519Umg<sup>-1</sup>), para la enzima inmovilizada. Se añadieron a cada vial, 1.5 mL de hexano (HPLC), 0.4 mmol de (*R*, *S*)-1-fenil-2-propanol (55 μl) y 1.2 mmol de butirato de vinilo (152 μl). A continuación se repitió el procedimiento experimental descrito en el apartado 6.4.2.1.1.1.

Para determinar la conversión de las diferentes reacciones, los productos de reacción se cuantificaron cromatográficamente mediante extrapolación de los valores de área obtenidos en una recta de calibrado realizada previamente.

Para ello se prepararon disoluciones sucesivas de los dos enantiómeros del reactivo de partida, como se muestra en la Tabla 152. Las rectas de calibrado del reactivo de partida se representan en la Figura 189 y se ajustó a un modelo polinómico de primer grado según el programa estadístico POLNOM del paquete informático SIMFIT.

Tabla 152. Disoluciones sucesivas de 1-fenil-2-propanol para la recta de calibrado.

Patrones	Concentración (mM)
1	0,1
2	0,25
3	0,5
4	1,5
5	2,5

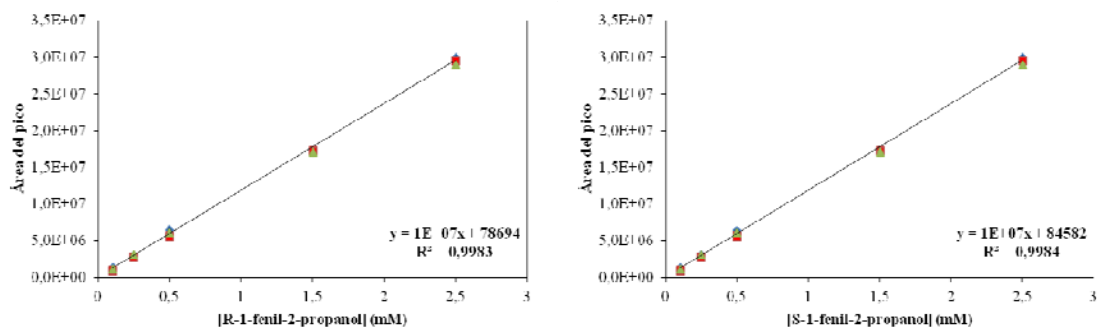


Figura 189. Rectas de calibrado para el 1-fenil-2-propanol.

#### 6.4.2.1.3.2. Resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-2-propanol (35) con lipasa de *Pseudomonas cepacia*.

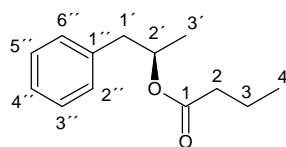
Se llevo a cabo siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.4.2.1.3.1 con 80 mg de preparado enzimático (1.2 mg de enzima, 232Umg<sup>-1</sup>) para la enzima libre, y 30 mg del derivado inmovilizado poli(BGMPME-*co*-DVB)-5 (0.54 mg de enzima, 200Umg<sup>-1</sup>).

#### 6.4.2.1.3.3. Resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-2-propanol (35) con lipasa de *Pseudomonas stutzeri*.

Se llevo a cabo siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.4.2.1.3.1 con 5 mg de preparado enzimático (0.8 mg de enzima, 105Umg<sup>-1</sup>) para la enzima libre, y 48 mg del derivado inmovilizado poli(BGMPMA-*co*-EGDMA)-8 (0.8 mg de enzima, 87U mg<sup>-1</sup>).

#### 6.4.2.1.3.4. Caracterización del producto (*R*)-butirato de 1-fenil-2-propilo (37).

Una vez transcurrido el tiempo de reacción, la reacción se filtra a vacío sobre un embudo buchner y con el filtrado se realiza una columna cromatográfica empleando como fase estacionaria, sílica gel, y como fase móvil hexano/acetato de etilo, 5/1 (v/v). Una vez aislado el producto, se realizó su determinación estructural mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear y la medida del poder óptico rotatorio del producto.



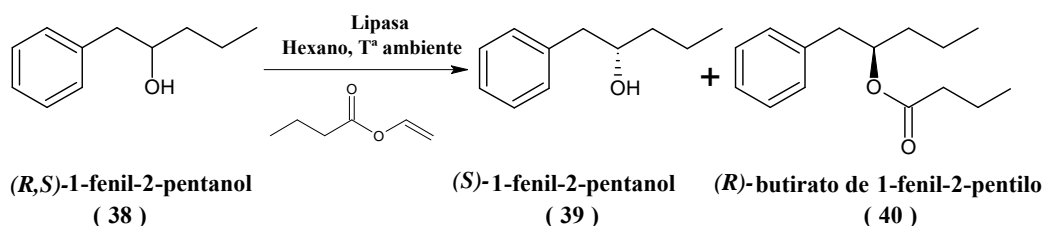
(37)

**RMN-<sup>1</sup>H**, 300 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 0.93 (t, J<sub>4,3</sub>: 7.34Hz, 3H, H-4), 1.26 (d, J<sub>3',2'</sub>: 6.29Hz, 3H, H-3'), 1.64 (m, J<sub>3,4;3,2</sub>: 7.40Hz, 2H, H-3), 2.26 (m, 2H, H-2), 2.85 (dd, J<sub>1'a,1'b</sub>: 13.64Hz, J<sub>1'a,2'</sub>: 6.38Hz, 1H, H-1'a), 2.96 (dd, J<sub>1'b,1'a</sub>: 13.64Hz, J<sub>1'b,2'</sub>: 6.96Hz, 1H, H-1'a), 5.19 (m, J: 6.44Hz, J: 6.29Hz, 1H, H-2'), 7.25 (m, 3H, H-2'', H-4'', H-6''), 7.32 (m, 2H, H-3'', H-5'').

**RMN-<sup>13</sup>C**, 75.5 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 13.53 (C-4), 18.40 (C-3), 19.51 (C-3'), 36.49 (C-2), 42.28 (C-1'), 71.11 (C-2'), 126.37 (C-4''), 128.24 (C-3'', C-5''), 129.36 (C-2'', C-6''), 137.64 (C-1''), 173.07 (C-1).

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: -20.8 (CHCl<sub>3</sub>)

6.4.2.1.4. Resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-2-pentanol (38).



Esquema 68. Resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-2-pentanol (38) catalizada por lipasas.

6.4.2.1.4.1. Resolución cinética de (*R, S*)-1-fenil-2-pentanol (38) con lipasa de *Pseudomonas fluorescens*.

En viales de vidrio de 10 mL, con tapón, se pesaron 17 mg de preparado enzimático (0.2 mg de enzima, 611Umg<sup>-1</sup>), para la enzima libre, y 10 mg del derivado inmovilizado poli(GMA-co-HDDMA)-2 (0.12 mg de enzima, 519Umg<sup>-1</sup>), para la enzima inmovilizada. Se añadieron a cada vial, 1.5 mL de hexano (HPLC), 0.4 mmol de (*R, S*)-1-fenil-2-pentanol (69 μl) y 1.2 mmol de butirato de vinilo (152 μl). A continuación se repitió el procedimiento experimental descrito en el apartado 6.4.2.1.1.1.

Para determinar la conversión de las diferentes reacciones, los productos de reacción se cuantificaron cromatográficamente mediante extrapolación de los valores de área obtenidos en una recta de calibrado realizada previamente.

Para ello se prepararon disoluciones sucesivas de los dos enantiómeros del reactivo de partida, como se muestra en la Tabla 153. Las rectas de calibrado del reactivo de partida se representan en la Figura 190 y se ajustó a un modelo poli nómico de primer grado según el programa estadístico POLNOM del paquete informático SIMFIT.

Tabla 153. Disoluciones sucesivas de 1-fenil-2-pentanol para la recta de calibrado.

Patrones	Concentración (mM)
1	0,1
2	0,25
3	0,5
4	1,5
5	2,5

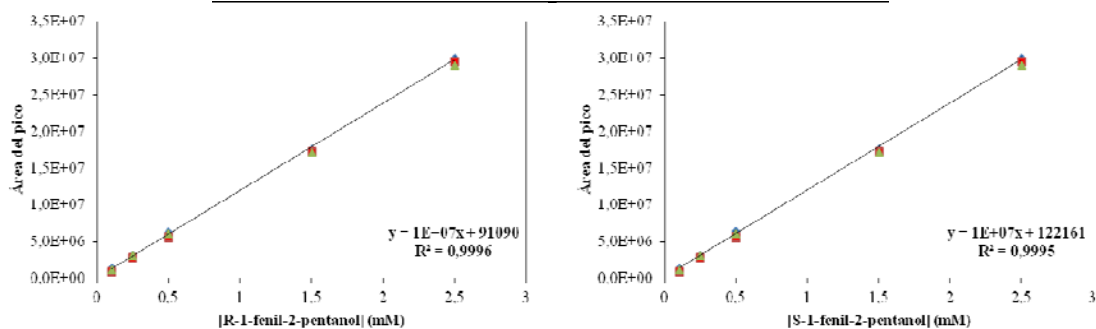


Figura 190. Rectas de calibrado para el 1-fenil-2-pentanol.

#### 6.4.2.1.4.2. Resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-2-pentanol (38) con lipasa de *Pseudomonas cepacia*.

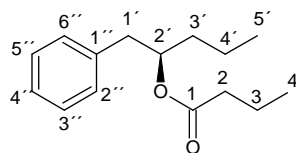
Este estudio se llevo a cabo empleando 80 mg de preparado enzimático (1.2 mg de enzima, 232Umg<sup>-1</sup>) para la enzima libre, y 30 mg del derivado inmovilizado poli(BGMPME-*co*-DVB)-5 (0.54 mg de enzima, 200Umg<sup>-1</sup>), repitiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.4.2.1.4.1.

#### 6.4.2.1.4.3. Resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-2-propanol (38) con lipasa de *Pseudomonas stutzeri*.

Se emplearon 5 mg de preparado enzimático (0.8 mg de enzima, 105Umg<sup>-1</sup>) para la enzima libre, y 48 mg del derivado inmovilizado poli(BGMPMA-*co*-EGDMA)-8 (0.8 mg de enzima, 87Umg<sup>-1</sup>), repitiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.4.2.1.4.1.

#### 6.4.2.1.4.4. Caracterización del producto (*R*)-butirato de 1-fenil-2-pentilo (40).

Una vez transcurrido el tiempo de reacción, la reacción se filtra a vacío sobre un embudo buchner y con el filtrado se realiza una columna cromatográfica empleando como fase estacionaria, sílica gel, y como fase móvil hexano/acetato de etilo, 5/1 (v/v). Una vez aislado el producto, se realizó su determinación estructural mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear y la medida del poder óptico rotatorio del producto.



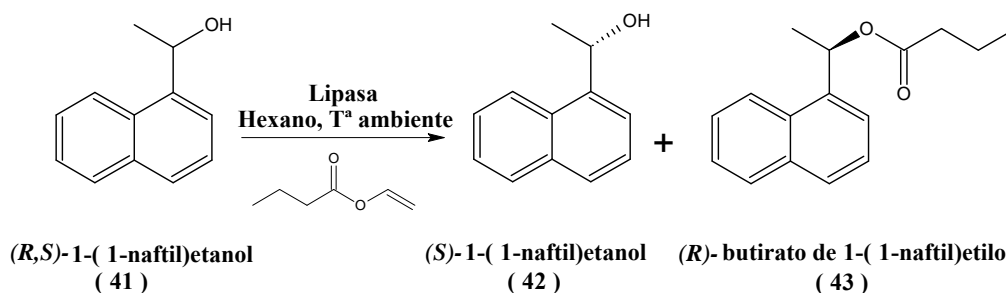
(40)

**RMN-<sup>1</sup>H**, 300 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 0.93 (m, 6H, H-4, H-5'), 1.41 (m, 2H, H-4'), 1.51 (m, 2H, H-3'), 1.54 (m, 2H, H-3), 2.26 (td, J<sub>3',4'</sub>: 7.39, J<sub>3',2'</sub>: 1.43, 2H, H-2), 2.88 (m, 2H, H-1'), 5.17 (m, 1H, H-2'), 7.25 (m, 3H, H-2'', H-4'', H-6''), 7.32 (m, 2H, H-3'', H-5'').

**RMN-<sup>13</sup>C**, 75.5 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 13.83 (C-4, C-5), 18.41 (C-3), 18.60 (C-4'), 35.73 (C-3'), 36.42 (C-2), 40.66 (C-1'), 74.17 (C-2'), 126.28 (C-4''), 128.20 (C-3'', C-5''), 129.36 (C-2'', C-6''), 137.69 (C-1''), 173.15 (C-1).

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: +18.6 (CHCl<sub>3</sub>).

### 6.4.2.1.5. Resolución cinética de (*R, S*)-1-(1-naftil) etanol (41).



Esquema 69. Resolución cinética de (*R, S*)-1-(1-naftil) etanol catalizada por lipasas.

#### 6.4.2.1.5.1. Resolución cinética de (*R,S*)-1-(1-naftil) etanol (41) con lipasa de *Pseudomonas fluorescens*.

En viales de vidrio de 10 mL, con tapón, se pesaron 102 mg de preparado enzimático (1.2 mg de enzima, 611Umg<sup>-1</sup>), para la enzima libre, y 100 mg del derivado inmovilizado poli(GMA-co-HDDMA)-2 (1.2 mg de enzima, 519Umg<sup>-1</sup>), para la enzima inmovilizada. Se añadieron a cada vial, 1.5 mL de hexano (HPLC), 0.1 mmol de (*R, S*)-1-(1-naftil) etanol (17 mg) y 0.3 mmol de butirato de vinilo (38 μl). A continuación se repitió el procedimiento experimental descrito en el apartado 6.4.2.1.1.1. Para determinar la conversión de las diferentes reacciones, los productos de reacción se cuantificaron cromatográficamente mediante extrapolación de los valores de área obtenidos en una recta de calibrado realizada previamente. Para ello se prepararon disoluciones sucesivas de los dos enantiómeros del reactivo de partida, como se muestra en la Tabla 154. Las rectas de calibrado del reactivo de partida se representan en la Figura 191 y se ajustó a un modelo poli nómico de primer grado según el programa estadístico POLNOM del paquete informático SIMFIT.

Tabla 154. Disoluciones sucesivas de 1-(1-naftil) etanol para la recta de calibrado.

Patrones	Concentración (mM)
1	0,1
2	0,25
3	0,5
4	1,5
5	2,5

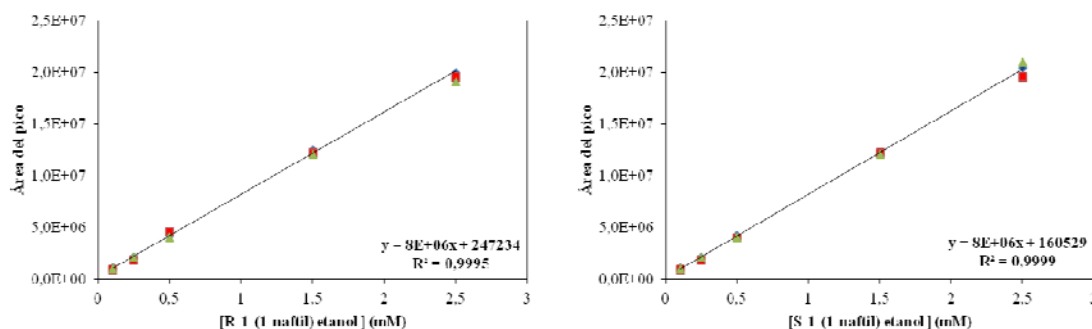


Figura 191. Rectas de calibrado para el 1-(1-naftil) etanol.

#### 6.4.2.1.5.2. Resolución cinética de (*R*, *S*)-1-(1-naftil) etanol (41) con lipasa de *Pseudomonas cepacia*.

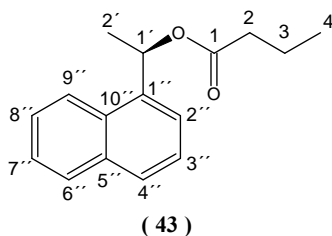
Se llevo a cabo siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.4.2.1.5.1 empleando 200 mg de preparado enzimático (3.0 mg de enzima, 232Umg<sup>-1</sup>) para la enzima libre, y 70 mg del derivado inmovilizado poli(BGMPME-*co*-DVB)-5 (1.25 mg de enzima, 200Umg<sup>-1</sup>).

#### 6.4.2.1.5.3. Resolución cinética de (*R*, *S*)-1-(1-naftil) etanol (41) con lipasa de *Pseudomonas stutzeri*.

Se llevo a cabo siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.4.2.1.5.1 empleando 5 mg de preparado enzimático (0.8 mg de enzima, 105Umg<sup>-1</sup>) para la enzima libre, y 48 mg del derivado inmovilizado poli(BGMPMA-*co*-EGDMA)-8 (0.8 mg de enzima, 87Umg<sup>-1</sup>).

#### 6.4.2.1.5.4. Caracterización del producto (*R*)-butirato de 1-(1-naftil) etilo (43).

Una vez transcurrido el tiempo de reacción, la reacción se filtra a vacío sobre un embudo buchner y con el filtrado se realiza una columna cromatográfica empleando como fase estacionaria, sílica gel, y como fase móvil hexano/acetato de etilo, 5/1 (v/v). Una vez aislado el producto, se realizó su determinación estructural mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear y la medida del poder óptico rotatorio del producto.



**RMN-<sup>1</sup>H**, 300 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 0.97 (t, J<sub>4,3</sub>: 7.38Hz, 3H, H-4), 1.71 (m, 2H, H-3), 1.73 (d, J<sub>2',1'</sub>: 6.76Hz, 3H, H-2'), 2.38 (m, 2H, H-2), 6.70 (q, J<sub>1',2'</sub>: 6.50, 1H, H-1'), 7.47 (m, 1H, H-3''), 7.50 (m, 1H, H-7''), 7.55 (m, 1H, H-8''), 7.63 (m, 1H, H-2''), 7.82 (m, 1H, H-4''), 7.88 (m, 1H, H-6''), 8.12 (m, 1H, H-9'').

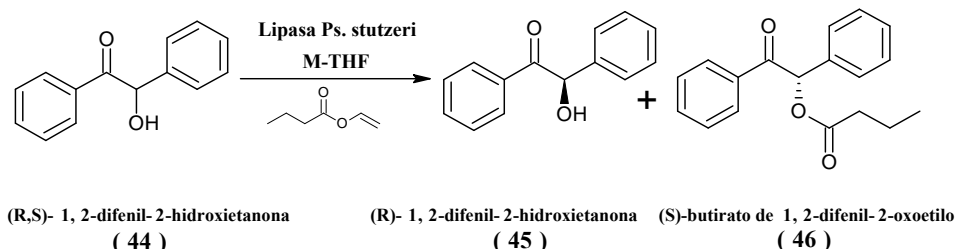
**RMN-<sup>13</sup>C**, 75.5 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 13.61 (C-4), 18.45 (C-3), 21.67 (C-2'), 36.49 (C-2), 69.10 (C-1'), 123.11 (C-2''), 123.14 (C-9''), 125.27 (C-3''), 125.57 (C-7''), 126.18 (C-8''), 128.32 (C-4''), 128.82 (C-6''), 130.23 (C-10''), 133.78 (C-5''), 137.53 (C-1''), 172.86 (C-1).

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: +21.3 (CHCl<sub>3</sub>).



### 6.4.2.1.6. Resolución cinética de diferentes (*R*, *S*)-1,2-diaril-2-hidroxi-2-tanonas.

#### 6.4.2.1.6.1. Resolución cinética de (*R*, *S*)-1,2-difenil-2-hidroxi-2-tanona (44) con lipasa de *Pseudomonas stutzeri*.



**Esquema 70.** Resolución cinética de (*R*, *S*)-1,2-difenil-2-hidroxi-2-tanona (44).

En viales de vidrio de 10 mL, con tapón, se pesaron 20 mg de preparado enzimático (3.2 mg de enzima, 105Umg<sup>-1</sup>), para la enzima libre, y 200 mg del derivado inmovilizado poli(GMA-co-HDDMA)-2 (3.12 mg de enzima, 87Umg<sup>-1</sup>), para la enzima inmovilizada. Se añadieron a cada vial, 1.5 mL de metil-tetrahidrofurano (HPLC), 0.094 mmol de (*R*, *S*)-1,2-difenil-2-hidroxi-2-tanona (20 mg) y 0.3 mmol de butirato de vinilo (38 μl). A continuación se repitió el procedimiento descrito en el apartado 6.4.2.1.1.1.

Una vez transcurrido el tiempo de reacción, la reacción se filtra a vacío sobre un embudo buchner y con el filtrado se realiza una columna cromatográfica empleando como fase estacionaria, sílica gel, y como fase móvil hexano/acetato de etilo, 5/1 (v/v). Para determinar la conversión de las diferentes reacciones, los productos de reacción se cuantificaron cromatográficamente mediante extrapolación de los valores de área obtenidos en una recta de calibrado realizada previamente.

Para ello se prepararon disoluciones sucesivas de los dos enantiómeros del reactivo de partida, como se muestra en la Tabla 155. Las rectas de calibrado del reactivo de partida se representan en la Figura 192 y se ajustó a un modelo polinómico de primer grado según el programa estadístico POLNOM del paquete informático SIMFIT.

**Tabla 155.** Disoluciones sucesivas de 1-(1-naftil) etanol para la recta de calibrado.

Patrones	Concentración (mM)
1	0,1
2	0,25
3	0,5
4	1,5
5	2,5

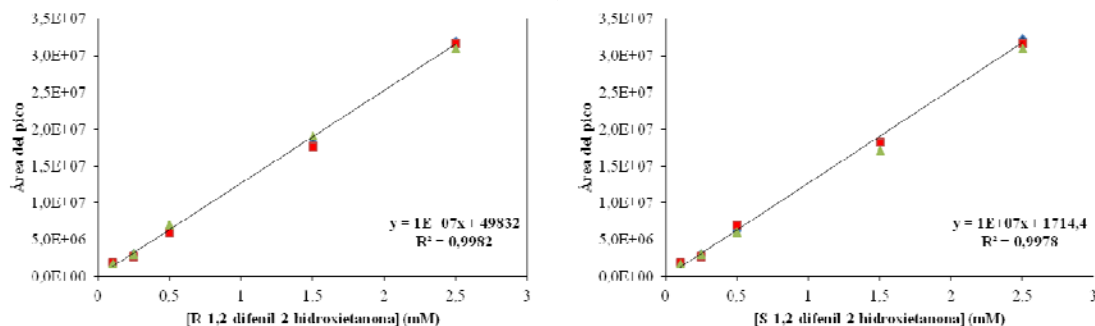


Figura 192. Rectas de calibrado para 1,2-difenil-2-hidroxietaona.

#### 6.4.2.1.6.1.1. Resolución cinética de (*R*, *S*)-1,2-difenil-2-hidroxietaona (44) con lipasa de *Pseudomonas stutzeri* en presencia de disolventes sostenibles.

- **Disolventes provenientes de biomasa.**

En este caso, se sustituyeron los disolventes derivados de biomasa empleados con la  $\beta$ -galactosidasa de *B. circulans* (1-isopropoxi-3-(2,2,2-trifluoroetoxi)propan-2-ol (GC7), 1,3-bis(2,2,2-trifluoroetoxi)propan-2-ol (GC8) y 2-hidroxi-*N,N*-dimetilpropanamida (DMA1)), que poseían grupos funcionales alcohol libres que podían interferir en el proceso de resolución cinética de alcoholes secundarios, por otros que no tuvieran alcoholes libre: 2-metoxi-1,3-bis(2,2,2-trifluoroetoxi)propano (GC9), 1-(3-butoxi-2-metoxipropoxi)butano (GC12), *N,N*-dimetilhexanamida (DMA3), *N,N*-dimetil octanamida (DMA4), *N,N*-dimetildecanamida (DMA5), *N,N*-dimetildodecanamida (DMA6). Este estudio se llevó a cabo siguiendo el procedimiento experimental descrito anteriormente en el apartado 6.4.2.1.6.1, sustituyendo el disolvente empleado en la resolución cinética (metil-tetrahidrofurano), por mezclas de metil-tetrahidrofurano 2 mM en disolvente sostenible proveniente de biomasa.

- **Líquidos iónicos.**

Este estudio se realizó con tres líquidos iónicos asequibles comercialmente: [Bmin] [PF<sub>6</sub>], [Emin] [BF<sub>4</sub>] y [Bmin] [PAF]. Este estudio se llevó a cabo siguiendo el procedimiento experimental descrito anteriormente en el apartado 6.4.2.1.6.1, sustituyendo el disolvente empleado en la resolución cinética (metil-tetrahidrofurano), por mezclas de metil-tetrahidrofurano al 30% en líquido iónico.

#### 6.4.2.1.6.1.2. Reutilización de la lipasa de *Pseudomonas stutzeri* inmovilizada sobre poli(GMA-*co*-HDDMA)-2 en la resolución cinética de (*R*, *S*)-1,2-difenil-2-hidroxietaona (44).

- **Reutilización en metil-tetrahidrofurano:**

En viales de vidrio de 10 mL, con tapón, se pesaron 400 mg del derivado inmovilizado poli(GMA-*co*-HDDMA)-2 (6.24 mg de enzima, 87Umg<sup>-1</sup>). A continuación se añadieron a cada

vial, 1.5 mL de metil-tetrahidrofurano (HPLC), 0.094 mmol de (R, S)-1,2-difenil-2-hidroxi-etanona (20 mg) y 0.3 mmol de butirato de vinilo (38  $\mu$ l). Se agitaron las mezclas de reacción a temperatura ambiente, 200 r.p.m. durante 3 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se repitió el procedimiento descrito en el apartado 6.4.2.1.2.1. Estas reacciones de reutilización se repitieron 15 veces con el mismo derivado inmovilizado.

- **Reutilización en disolventes sostenibles provenientes de biomasa.**

Este estudio se realizó con 6 disolventes sostenibles diferentes provenientes de biomasa: GC9, GC12, DMA3, DMA4, DMA5 y DMA6, y se llevó a cabo repitiendo el procedimiento anterior sustituyendo en disolvente (metil-tetrahidrofurano) por mezclas metil-tetrahidrofurano 2 mM en disolvente sostenible.

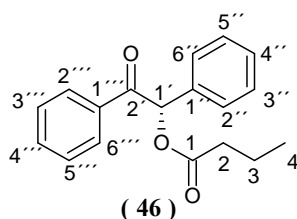
- **Reutilización en líquidos iónicos.**

Este estudio se realizó con tres líquidos iónicos diferentes: [Bmin] [PF<sub>6</sub>], [Bmin] [PAF] y [Emin] [BF<sub>4</sub>], y se llevó a cabo repitiendo el procedimiento que en la reutilización en hexano sustituyendo en disolvente (metil-tetrahidrofurano) por metil-tetrahidrofurano al 30 % el líquido iónico.

Con los líquidos iónicos (LIs) no se pudo realizar el estudio de reusabilidad debido a que los LIs quedaron atrapados en el derivado inmovilizado y no pudieron ser eliminados tras los lavados llevados a cabo con metil-tetrahidrofurano.

#### 6.4.2.1.6.1.3. Caracterización del producto (S)-butirato de 1,2-difenil-2-oxoetilo (46).

Una vez aislado el producto, se realizó su determinación estructural mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear y la medida del poder óptico rotatorio del producto.

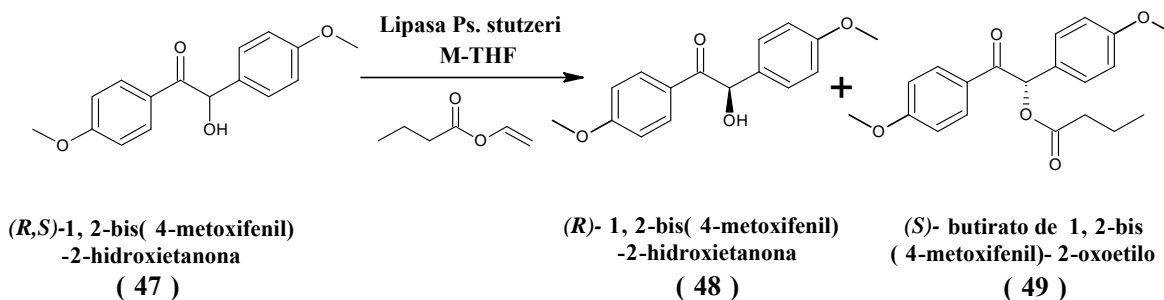


**RMN-<sup>1</sup>H**, 300 MHz (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 0.97 (t,  $J_{4,3}$ : 7.38Hz, 3H, H-4), 1.71 (m,  $J_{3,4;3,2}$ : 7.40Hz, 2H, H-3), 2.44 (m, 2H, H-2), 6.86 (s, 1H, H-1'), 7.33 (m, 1H, H-4''), 7.35 (m, 2H, H-3'', H5''), 7.40 (m, 2H, H-2'', H-6''), 7.46 (m, 2H, H-3''', H-5'''), 7.51 (m, 2H, H-2''', H-6''').

**RMN-<sup>13</sup>C**, 75.5 MHz (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 13.56 (C-4), 18.35 (C-3), 35.85 (C-2), 77.36 (C-1'), 128.57 (C-3'', C-5'', C-3''', C-5'''), 128.74 (C-4''), 129.04 (C-2'', C-6'', C-2''', C-6'''), 133.36 (C-4'''), 133.70 (C-1'', C-1'''), 173.10 (C-1), 193.92 (C-2').

$[\alpha]_D^{20}$ : +117.8 (CHCl<sub>3</sub>).

### 6.4.2.1.6.2. Resolución cinética de (*R*, *S*)-1,2-bis(4-metoxifenil)-2-hidroxiacetona (47) con lipasa de *Pseudomonas stutzeri*.

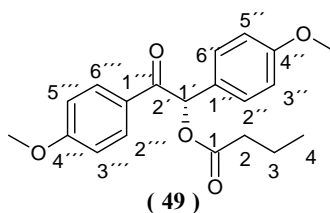


**Esquema 74.** Resolución cinética de (*R*, *S*)-1,2-bis (4-metoxifenil)-2-hidroxiacetona (47).

En viales de vidrio de 10 mL, con tapón, se pesaron 20 mg de preparado enzimático (3.2 mg de enzima, 105Umg<sup>-1</sup>), para la enzima libre, y 200 mg del derivado inmovilizado poli(GMA-*co*-HDDMA)-2 (3.12 mg de enzima, 87Umg<sup>-1</sup>), para la enzima inmovilizada. A continuación se añadieron a cada vial, 1.5 mL de metil-tetrahidrofurano (HPLC), 0.094 mmol de (*R*, *S*)-1,2-bis (4-metoxifenil)-2-hidroxiacetona (26 mg) y 0.3 mmol de butirato de vinilo (38 µl). A continuación se repitió el procedimiento descrito en el apartado 6.4.2.1.6.1.

#### 6.4.2.1.6.2.1. Caracterización del producto (*S*)-butirato de 1,2-bis (4-metoxifenil)-2-oxoetilo (49).

Una vez aislado el producto, se realizó su determinación estructural mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear y la medida del poder óptico rotatorio del producto.

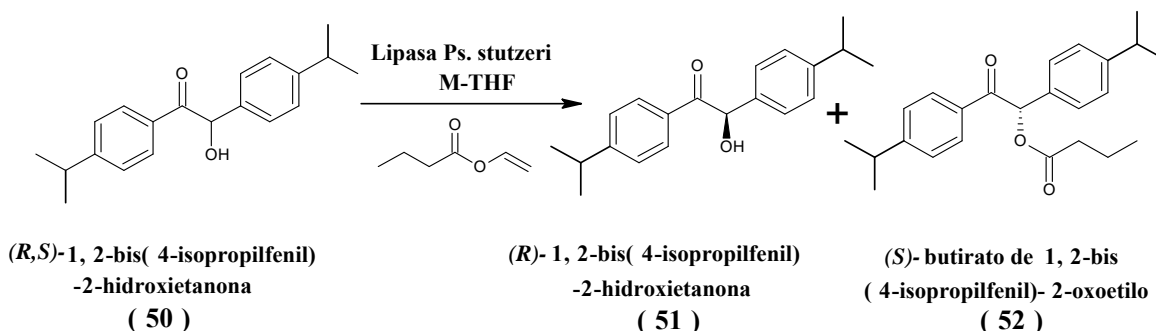


**RMN-<sup>1</sup>H**, 300 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 0.96 (t, J<sub>4,3</sub>:7.34Hz, 3H, H-4), 1.70 (m, J<sub>3,2;3,4</sub>: 7.40Hz, 2H, H-3), 2.42 (m, 2H, H-2), 3.75 (s, 3H, H-7''), 3.80 (s, 3H, H-7'''), 6.80 (s, 1H, H-1'), 6.85 (m, 4H, H-3'', H5'', H-3''', H-5'''), 7.37 (m, 2H, H-2'', H-6''), 7.91 (m, 2H, H-2''', H-6''').

**RMN-<sup>13</sup>C**, 75.5 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 13.59 (C-4), 18.36 (C-3), 35.85 (C-2), 55.21 (C-7''), 55.38 (C-7'''), 76.68 (C-1'), 113.78 (C-3'', C-5''), 114.46 (C-3''', C-5'''), 126.18 (C-1''), 127.55 (C-1'''), 130.02 (C-2'', C-6''), 131.07 (C-2''', C-6'''), 160.18 (C-4''), 163.60 (C-4'''), 173.19 (C-1), 192.25 (C-2').

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>:+104.0 (CHCl<sub>3</sub>)

### 6.4.2.1.6.3. Resolución cinética de (*R, S*)-1,2-bis (4-isopropilfenil)-2-hidroxiacetona (**50**) con lipasa de *Pseudomonas stutzeri*.

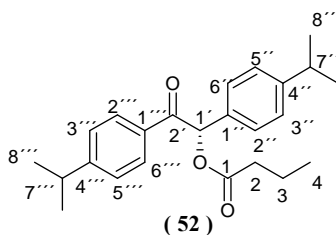


**Esquema 75.** Resolución cinética de (*R, S*)-1,2-bis (4-isopropilfenil)-2-hidroxiacetona (**50**).

En viales de vidrio de 10 mL, con tapón, se pesaron 20 mg de preparado enzimático (3.2 mg de enzima, 105Umg<sup>-1</sup>), para la enzima libre, y 200 mg del derivado inmovilizado poli(GMA-*co*-HDDMA)-2 (3.12 mg de enzima, 87Umg<sup>-1</sup>), para la enzima inmovilizada. A continuación se añadieron a cada vial, 1.5 mL de metil-tetrahidrofurano (HPLC), 0.094 mmol de (*R, S*)-1,2-bis (4-isopropilfenil)-2-hidroxiacetona (28 mg) y 0.3 mmol de butirato de vinilo (38 µl). A continuación se repitió el procedimiento descrito en el apartado 6.4.2.1.6.1.

#### 6.4.2.1.6.3.1. Caracterización del producto (*S*)-butirato de 1,2-bis (4-isopropilfenil)-2-oxoetilo (**52**).

Una vez aislado el producto, se realizó su determinación estructural mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear y la medida del poder óptico rotatorio del producto.

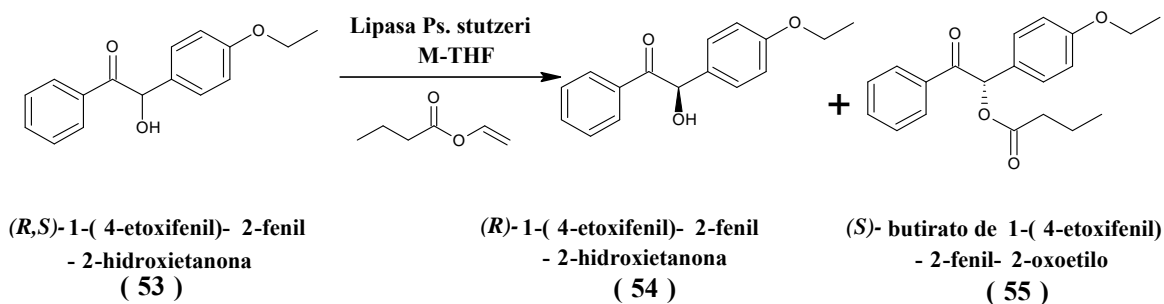


**RMN-<sup>1</sup>H**, 300 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 0.96 (t, J<sub>4,3</sub>: 7.38Hz, 3H, H-4), 1.20 (d, J<sub>8'',7''</sub>: 7.00Hz, 6H, H-8''), 1.21 (d, J<sub>8''',7'''</sub>: 7.00Hz, 6H, H-8'''), 1.70 (m, 2H, J<sub>3,2;3,4</sub>: 7.40Hz, H-3), 2.42 (m, 2H, H-2), 2.88 (m, 2H, H-7'', H-7'''), 6.82 (s, 1H, H-1'), 7.22 (m, 4H, H-3'', H-5'', H-3''', H-5'''), 7.38 (m, 2H, H-2'', H-6''), 7.89 (m, 2H, H-2''', H-6''').

**RMN-<sup>13</sup>C**, 75.5 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 13.63 (C-4), 18.36 (C-3), 23.58 (C-8''a), 23.81 (C-8''b), 33.87 (C-8'''a), 34.26 (C-8'''b), 35.91 (C-2), 77.14 (C-1'), 126.76 (C-3'', C-5''), 127.19 (C-3''', C-5'''), 128.66 (C-2'', C-6''), 129.10 (C-2''', C-6'''), 131.20 (C-1''), 132.57 (C-1'''), 150.00 (C-4''), 154.95 (C-4'''), 173.22 (C-1), 193.50 (C-2').

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: + 101.3 (CHCl<sub>3</sub>).

#### 6.4.2.1.6.4. Resolución cinética de (*R*, *S*)-1-(4-etoxifenil)-2-fenil-2-hidroxietanona (**53**) con lipasa de *Pseudomonas stutzeri*.

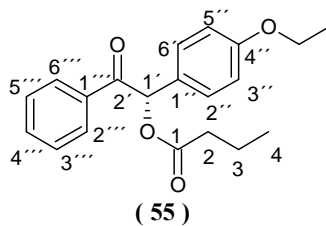


**Esquema 76.** Resolución cinética de (*R*, *S*)-1-(4-etoxifenil)-2-fenil-2-hidroxietanona (**53**)

En viales de vidrio de 10 mL, con tapón, se pesaron 20 mg de preparado enzimático (3.2 mg de enzima, 105Umg<sup>-1</sup>), para la enzima libre, y 200 mg del derivado inmovilizado poli(GMA-*co*-HDDMA)-2 (3.12 mg de enzima, 87Umg<sup>-1</sup>), para la enzima inmovilizada. A continuación se añadieron a cada vial, 1.5 mL de metil-tetrahidrofurano (HPLC), 0.094 mmol de (*R*, *S*)-1-(4-etoxifenil)-2-fenil-2-hidroxietanona (24 mg) y 0.3 mmol de butirato de vinilo (38 µl). A continuación se repitió el procedimiento descrito en el apartado 6.4.2.1.6.1.

##### 6.4.2.1.6.4.1. Caracterización del producto (*S*)-butirato de 1-(4-etoxifenil)-2-fenil-2-oxoetilo (**55**).

Una vez aislado el producto, se realizó su determinación estructural mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear y la medida del poder óptico rotatorio del producto.

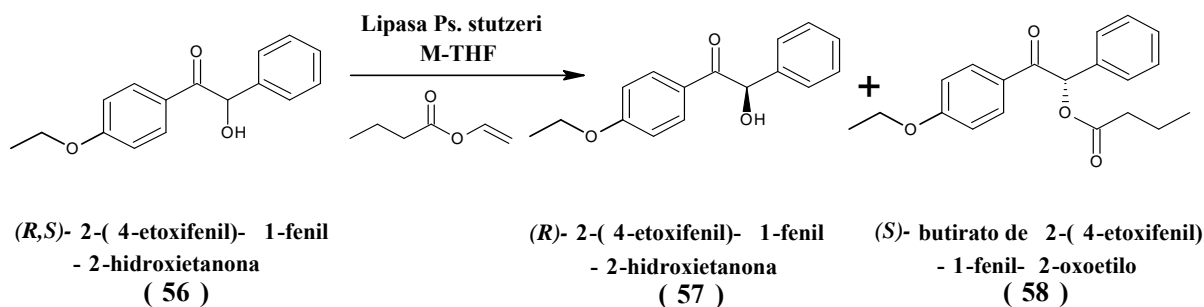


**RMN-<sup>1</sup>H**, 300 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 0.97 (t, J<sub>4,3</sub>:7.34Hz, 3H, H-4), 1.37 (t, J<sub>8'',7''</sub>: 7.06Hz, 3H, H-8''), 1.70 (m, J<sub>3,2;3,4</sub>: 7.40Hz, 2H, H-3), 2.43 (m, 2H, H-2), 3.98 (q, J<sub>7'',8''</sub>: 6.99Hz, 2H, H-7''), 6.81 (s, 1H, H-1'), 6.85 (m, 2H, H-3'', H-5''), 7.36 (m, 2H, H-2'', H-6''), 7.37 (m, 2H, H-3''', H-5'''), 7.49 (m, 1H, H-4'''), 7.91 (m, 2H, H-2''', H-6''').

**RMN-<sup>13</sup>C**, 75.5 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 13.60 (C-4), 14.71 (C-8''), 18.38 (C-3), 35.88 (C-2), 63.46 (C-7''), 77.02 (C-1'), 115.02 (C-3'', C-5''), 125.44 (C-4''), 128.55 (C-3''', C-5'''), 128.73 (C-2''', C-6'''), 130.12 (C-2'', C-6''), 133.26 (C-4'''), 134.79 (C-1'''), 159.70 (C-1''), 173.23 (C-1), 193.96 (C-2').

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: +138.1 (CHCl<sub>3</sub>)

**6.4.2.1.6.5. Resolución cinética de (*R*, *S*)-2-(4-etoxifenil)-1-fenil-2-hidroxi-etanona (56) con lipasa de *Pseudomonas stutzeri*.**

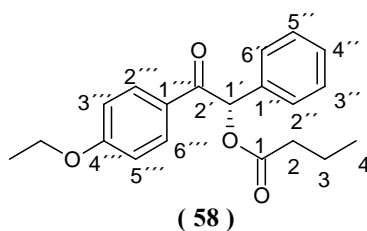


**Esquema 77.** Resolución cinética de (*R*, *S*)-2-(4-etoxifenil)-1-fenil-2-hidroxi-etanona (56).

En viales de vidrio de 10 mL, con tapón, se pesaron 20 mg de preparado enzimático (3.2 mg de enzima, 105Umg<sup>-1</sup>), para la enzima libre, y 200 mg del derivado inmovilizado poli(GMA-*co*-HDDMA)-2 (3.12 mg de enzima, 87Umg<sup>-1</sup>), para la enzima inmovilizada. A continuación se añadieron a cada vial, 1.5 mL de metil-tetrahidrofurano (HPLC), 0.094 mmol de (*R*, *S*)-2-(4-etoxifenil)-1-fenil-2-hidroxi-etanona (24 mg) y 0.3 mmol de butirato de vinilo (38 μl). A continuación se repitió el procedimiento descrito en el apartado 6.4.2.1.6.1.

**6.4.2.1.6.5.1. Caracterización del producto (*S*)-butirato de 2-(4-etoxifenil)-1-fenil-2-oxoetilo (58).**

Una vez aislado el producto, se realizó su determinación estructural mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear y la medida del poder óptico rotatorio del producto.

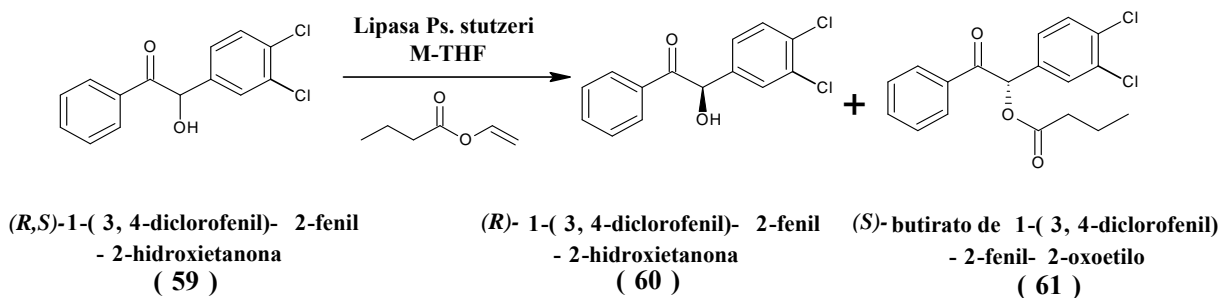


**RMN-<sup>1</sup>H**, 300 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 0.96 (t, J<sub>4,3</sub>:7.44Hz, 3H, H-4), 1.39 (t, J<sub>8'',7''</sub>: 7.06Hz, 3H, H-8''), 1.70 (m, J<sub>3,2;3,4</sub>: 7.44Hz, 2H, H-3), 2.44 (m, 2H, H-2), 4.04 (q, J<sub>7'',8''</sub>: 6.93Hz, 2H, H-7''), 6.83 (s, 1H, H-1'), 6.84 (m, 2H, H-3'', H-5''), 7.33 (m, 2H, H-3'', H-5''), 7.34 (m, 1H, H-4''), 7.45 (m, 2H, H-2'', H-6''), 7.91 (m, 2H, H-2'', H-6'').

**RMN-<sup>13</sup>C**, 75.5 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 13.60 (C-4), 14.58 (C-8''), 18.38 (C-3), 35.90 (C-2), 63.73 (C-7''), 77.05 (C-1'), 114.25 (C-3'', C-5''), 127.35 (C-4''), 128.52 (C-2'', C-6''), 128.99 (C-3'', C-5''), 129.06 (C-2'', C-6''), 131.13 (C-4''), 134.27 (C-1''), 163.14 (C-1''), 173.11 (C-1), 193.96 (C-2').

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>:+ 124.9 (CHCl<sub>3</sub>).

### 6.4.2.1.6.6. Resolución cinética de (*R,S*)-1-(3,4-diclorofenil)-2-fenil-2-hidroxi- etanona (**59**) con lipasa de *Pseudomonas stutzeri*.

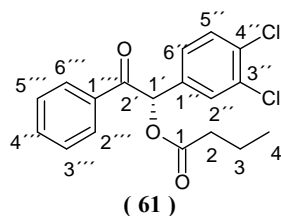


**Esquema 78.** Resolución cinética de (*R, S*)-1-(3,4-diclorofenil)-2-fenil-2-hidroxi-etanona (**59**).

En viales de vidrio de 10 mL, con tapón, se pesaron 20 mg de preparado enzimático (3.2 mg de enzima, 105Umg<sup>-1</sup>), para la enzima libre, y 200 mg del derivado inmovilizado poli(GMA-co-HDDMA)-2 (3.12 mg de enzima, 87Umg<sup>-1</sup>), para la enzima inmovilizada. A continuación se añadieron a cada vial, 1.5 mL de metil-tetrahidrofurano (HPLC), 0.094 mmol de (*R, S*)-1-(3,4-diclorofenil)-2-fenil-2-hidroxi-etanona (26 mg) y 0.3 mmol de butirato de vinilo (38 µl). A continuación se repitió el procedimiento descrito en el apartado 6.4.2.1.6.1.

#### 6.4.2.1.6.6.1. Caracterización del producto (*S*)-butirato de 1-(3,4-diclorofenil)-2-fenil-2-oxoetilo (**61**).

Una vez aislado el producto, se realizó su determinación estructural mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear y la medida del poder óptico rotatorio del producto.



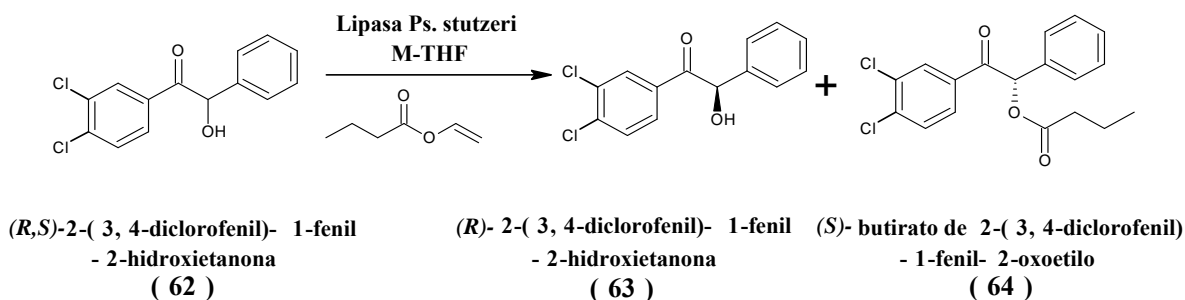
**RMN-<sup>1</sup>H**, 300 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 0.96 (t, J<sub>4,3</sub>:7.34Hz, 3H, H-4), 1.70 (m, J<sub>3,2;3,4</sub>: 7.44Hz, 2H, H-3), 2.43 (m, 2H, H-2), 6.79 (s, 1H, H-1'), 7.27 (dd, J<sub>6'',5''</sub>: 8.20Hz, J<sub>6'',2''</sub>: 2.10Hz, 1H, H-6''), 7.40 (m, 1H, H-4'''), 7.44 (m, 2H, H-3''', H-5'''), 7.53 (m, 1H, H-5''), 7.56 (m, 1H, H-2''), 7.90 (m, 2H, H-2''', H-6''').

**RMN-<sup>13</sup>C**, 75.5 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 13.57 (C-4), 18.32 (C-3), 35.76 (C-2), 75.70 (C-1'), 127.65 (C-6''), 128.72 (C-2''', C-6'''), 128.82 (C-3''', C-5'''), 130.32 (C-2''), 131.00 (C-4'''), 133.30 (C-3''), 133.64 (C-4''), 133.83 (C-5''), 133.87 (C-1'''), 134.36 (C-1''), 172.83 (C-1), 193.31 (C-2').

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: +102.4 (CHCl<sub>3</sub>).



**6.4.2.1.6.7. Resolución cinética de (*R*, *S*)-2-(3,4-diclorofenil)-1-fenil-2-hidroxi etanona (62) con lipasa de *Pseudomonas stutzeri*.**

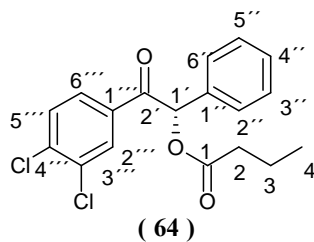


**Esquema 79.** Resolución cinética de (*R*, *S*)-2-(3,4-diclorofenil)-1-fenil-2-hidroxi etanona (62).

En viales de vidrio de 10 mL, con tapón, se pesaron 20 mg de preparado enzimático (3.2 mg de enzima, 105Umg<sup>-1</sup>), para la enzima libre, y 200 mg del derivado inmovilizado poli(GMA-*co*-HDDMA)-2 (3.12 mg de enzima, 87Umg<sup>-1</sup>), para la enzima inmovilizada. A continuación se añadieron a cada vial, 1.5 mL de metil-tetrahidrofurano (HPLC), 0.094 mmol de (*R*, *S*)-2-(3,4-diclorofenil)-1-fenil-2-hidroxi etanona (26 mg) y 0.3 mmol de butirato de vinilo (38 μl). A continuación se repite el procedimiento descrito en el apartado 6.4.2.1.6.1.

**6.4.2.1.6.7.1. Caracterización del producto (*S*)-butirato de 2-(3,4-diclorofenil)-1-fenil-2-oxoetilo (64).**

Una vez aislado el producto, se realizó su determinación estructural mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear y la medida del poder óptico rotatorio del producto.

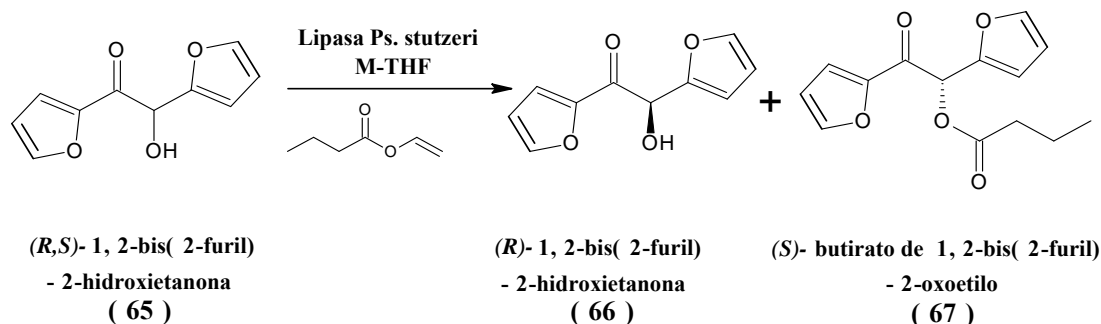


**RMN-<sup>1</sup>H**, 300 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 0.97 (t, J<sub>4,3</sub>:7.44Hz, 3H, H-4), 1.70 (m, J<sub>3,2;3,4</sub>: 7.44Hz, 2H, H-3), 2.45 (m, 2H, H-2), 6.72 (s, 1H, H-1'), 7.36 (m, 1H, H-6''), 7.38 (m, 2H, H-2'', H-6''), 7.40 (m, 1H, H-4''), 7.42 (m, 2H, H-3'', H-5''), 7.46 (m, J<sub>5'',6''</sub>: 8.39Hz, 1H, H-5''), 7.73 (dd, J<sub>6'',5''</sub>: 8.39Hz, J<sub>6'',2''</sub>: 2.10Hz, 1H, H-6''), 8.00 (d, J<sub>2'',6''</sub>: 2.10Hz, 1H, H-2'').

**RMN-<sup>13</sup>C**, 75.5 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 13.57 (C-4), 18.35 (C-3), 35.78 (C-2), 77.29(C-1'), 127.67 (C-6''), 128.51 (C-2'', C-6''), 129.28 (C-3'', C-5''), 129.57 (C-4''), 130.73 (C-2'', C-5''), 132.90 (C-1'), 133.44 (C-1''), 134.24 (C-3''), 138.07 (C-4''), 173.16 (C-1), 191.98 (C-2).

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: +92.0 (CHCl<sub>3</sub>).

#### 6.4.2.1.6.8. Resolución cinética de (*R, S*)-1,2-bis (2-furil)-2-hidroxi-etanona (65) con lipasa de *Pseudomonas stutzeri*.

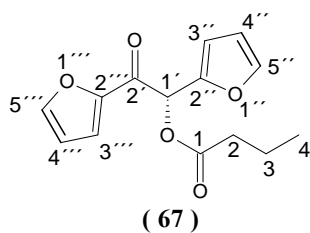


**Esquema 80.** Resolución cinética de (*R, S*)-1,2-bis (2-furil)-2-hidroxi-etanona (65).

En viales de vidrio de 10 mL, con tapón, se pesaron 20 mg de preparado enzimático (3.2 mg de enzima, 105Umg<sup>-1</sup>), para la enzima libre, y 200 mg del derivado inmovilizado poli(GMA-co-HDDMA)-2 (3.12 mg de enzima, 87Umg<sup>-1</sup>), para la enzima inmovilizada. A continuación se añadieron a cada vial, 1.5 mL de metil-tetrahidrofurano (HPLC), 0.094 mmol de (*R, S*)-1,2-(2-furil)-2-hidroxi-etanona (18 mg) y 0.3 mmol de butirato de vinilo (38 μl). A continuación se repitió el procedimiento descrito en el apartado 6.4.2.1.6.1.

##### 6.4.2.1.6.8.1. Caracterización del producto (*S*)-butirato de 1,2-bis (2-furil)-2-oxoetilo (67).

Una vez aislado el producto, se realizó su determinación estructural mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear y la medida del poder óptico rotatorio del producto.

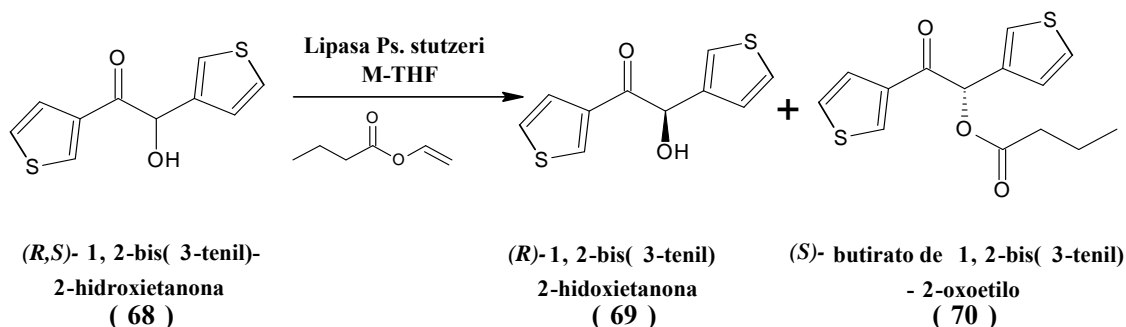


**RMN-<sup>1</sup>H**, 300 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 0.96 (t, J<sub>4,3</sub>:7.44Hz, 3H, H-4), 1.70 (m, J<sub>3,2;3,4</sub>: 7.40Hz, 2H, H-3), 2.43 (m, 2H, H-2), 6.36 (dd, J<sub>3''',4''</sub>: 3.24Hz, J<sub>3''',5'''</sub>: 1.91Hz, 1H, H-3'''), 6.48 (d, J<sub>4''',3'''</sub>: 3.05Hz, 1H, H-4'''), 6.50 (dd, J<sub>3'',4''</sub>: 3.62Hz, J<sub>3'',5''</sub>: 1.72Hz, 1H, H-3''), 6.76 (s, 1H, H-1'), 7.24 (dd, J<sub>4'',3''</sub>: 3.62Hz, J<sub>4'',5''</sub>: 0.57Hz, 1H, H-4''), 7.43 (dd, J<sub>5''',4''</sub>: 3.62Hz, J<sub>5''',3'''</sub>: 0.57Hz, 1H, H-5'''), 7.56 (dd, J<sub>5'',4''</sub>: 1.72Hz, J<sub>5'',3''</sub>: 0.76Hz, 1H, H-5'').

**RMN-<sup>13</sup>C**, 75.5 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 13.48 (C-4), 18.25 (C-3), 35.55 (C-2), 70.13 (C-1'), 110.95(C-3'''), 111.53 (C-3''), 112.40 (C-4'''), 119.05 (C-4''), 144.07 (C-5'''), 146.58 (C-2''), 147.08 (C-5''), 150.19 (C-2'), 172.70 (C-1), 179.73 (C-2').

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: +103.8 (CHCl<sub>3</sub>).

**6.4.2.1.6.9. Resolución cinética de (*R*, *S*)-1,2-bis(3-tenil)-2-hidroxietanona (68) con lipasa de *Pseudomonas stutzeri*.**

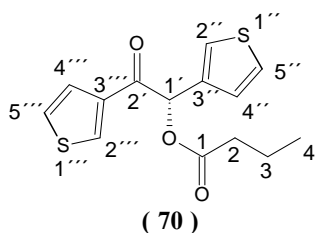


**Esquema 81.** Resolución cinética de (*R*, *S*)-1,2-bis (3-tenil)-2-hidroxietanona (68).

En viales de vidrio de 10 mL, con tapón, se pesaron 20 mg de preparado enzimático (3.2 mg de enzima, 105Umg<sup>-1</sup>), para la enzima libre, y 200 mg del derivado inmovilizado poli(GMA-*co*-HDDMA)-2 (3.12 mg de enzima, 87Umg<sup>-1</sup>), para la enzima inmovilizada. A continuación se añadieron a cada vial, 1.5 mL de metil-tetrahidrofurano (HPLC), 0.094 mmol de (*R*, *S*)-1,2-(3-tenil)-2-hidroxietanona (21 mg) y 0.3 mmol de butirato de vinilo (38 μl). A continuación se repitió el procedimiento descrito en el apartado 6.4.2.1.6.1.

**6.4.2.1.6.9.1. Caracterización del producto (*S*)-butirato de 1,2-bis (3-tenil)-2-oxoetilo (70).**

Una vez aislado el producto, se realizó su determinación estructural mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear y la medida del poder óptico rotatorio del producto.



**RMN-<sup>1</sup>H**, 300 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 0.96 (t, J<sub>4,3</sub>:7.44Hz, 3H, H-4), 1.70 (m, J<sub>3,2;3,4</sub>: 7.40Hz, 2H, H-3), 2.44 (m, 2H, H-2), 6.74 (s, 1H, H-1'), 7.13 (dd, J<sub>5'',4''</sub>: 5.05Hz, J<sub>5'',2''</sub>: 1.24Hz, 1H, H-5''), 7.26 (dd, J<sub>2'',4''</sub>: 5.15Hz, J<sub>2'',5''</sub>: 2.86Hz, 1H, H-2''), 7.31 (dd, J<sub>2'',4''</sub>: 5.05Hz, J<sub>2'',5''</sub>: 2.96Hz, 1H, H-2'''), 7.41 (dd, J<sub>4'',5''</sub>: 2.77Hz, J<sub>4'',2''</sub>: 0.86Hz, 1H, H-4'''), 7.52 (dd, J<sub>5'',4''</sub>: 5.15Hz, J<sub>5'',2''</sub>: 1.14Hz, 1H, H-5'), 8.09 (dd, J<sub>4'',5''</sub>: 2.86Hz, J<sub>4'',2''</sub>: 1.34Hz, 1H, H-4').

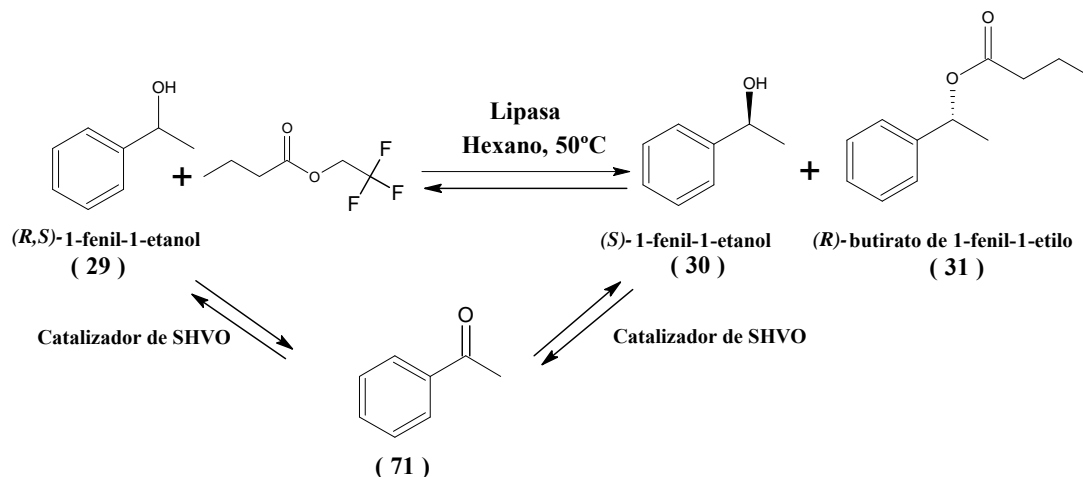
**RMN-<sup>13</sup>C**, 75.5 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 13.54 (C-4), 18.31 (C-3), 35.78 (C-2), 73.85 (C-1'), 125.50 (C-4'''), 126.32 (C-2''), 126.88 (C-2'''), 126.92 (C-5'''), 127.23 (C-5'), 133.24 (C-4'), 134.28 (C-3'''), 138.81 (C-3''), 172.94 (C-1), 187.62 (C-2').

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>:+92.1 (CHCl<sub>3</sub>).

### 6.4.2.2. Resoluciones cinéticas dinámicas.

#### 6.4.2.2.1. Resolución cinética dinámica de (*R*, *S*)-1-fenil-1-etanol (29) por combinación de lipasas y el catalizador de Shvo.

Estos experimentos se llevaron a cabo siguiendo el esquema 72 representado a continuación:



**Esquema 72.** Resolución cinética dinámica de (*R*, *S*)-1-fenil-1-etanol (29) por combinación de lipasas y el catalizador de Shvo.

#### 6.4.2.2.1.1. Resolución cinética dinámica de (*R*, *S*)-1-fenil-1-etanol (29) por combinación de lipasa de *Pseudomonas fluorescens* y el catalizador de Shvo.

En un matraz de 5 mL, se añadieron 200 mg del derivado inmovilizado poli(GMA-*co*-HDDMA)-2 (2.4 mg de enzima, 519Umg<sup>-1</sup>), 0.4 mmol de (*R*, *S*)-1-fenil-1-etanol (48 μl), 1.2 mmol de butirato de trifluoroetilo (182 μl), 0.02 mmol del catalizador de Shvo (20 mg) y 1.5 mL de hexano. A continuación se añadió un imán en forma de aspa, se cerró el matraz con un septum y se purgó el sistema con argón. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación bajo atmósfera inerte a 50 °C durante 20 horas. Una vez transcurrido este tiempo se tomó una alícuota de 40 μl, se añadieron sobre 200 μl hexano/2-propanol (50/50, (v/v)). Estas soluciones se filtraron a través de filtros Miles<sup>®</sup>-GV, PVDF de tamaño de poro de 0,22 μm con el fin de eliminar posibles restos de enzima y de derivado inmovilizado que puedan dañar la columna quiral de HPLC. Cada muestra fue analizada mediante HPLC (*n*-hexano: 2-propanol, 90:10; Flujo 0,8 mL/min; columna quiral Chiralcel OD<sup>®</sup>, λ<sub>max</sub> = 246 nm).

#### 6.4.2.2.1.1.1. Reutilización de la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* inmovilizada sobre poli(GMA-*co*-HDDMA)-2 en la resolución cinética dinámica de (*R*, *S*)-1-fenil-1-etanol (29).

Se llevó a cabo siguiendo el procedimiento experimental descrito anteriormente en el apartado 6.4.2.2.1.1. A continuación, el derivado inmovilizado se filtró en un embudo buchner, se lavo con 5 mL de hexano, se deja secar al aire sobre papel de filtro y se repite el proceso

descrito anteriormente. Estas reacciones de reutilización se repitieron 5 veces con el mismo derivado inmovilizado.

#### **6.4.2.2.1.2. Resolución cinética dinámica de 1-fenil-1-etanol (29) por combinación de lipasa de *Pseudomonas cepacia* y el catalizador de Shvo.**

En un matraz de 5 mL, se añadieron 173 mg del derivado inmovilizado poli(BGMPME-co-DVB)-5 (3.12 mg de enzima, 200 U $\text{mg}^{-1}$ ), 0.4 mmol de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol (48  $\mu\text{l}$ ), 1.2 mmol de butirato de trifluoroetilo (182  $\mu\text{l}$ ), 0.02 mmol del catalizador de Shvo (20 mg) y 1.5 mL de hexano. A continuación se sigue el protocolo descrito en el apartado 6.4.2.2.1.1.

##### **6.4.2.2.1.2.1. Reutilización de la lipasa de *Pseudomonas cepacia* inmovilizada sobre poli(GMA-co-HDDMA)-2 en la resolución cinética dinámica de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol (29).**

Se llevó a cabo siguiendo el procedimiento experimental descrito en el apartado 6.4.2.2.1.1. A continuación, el derivado inmovilizado se filtró en un embudo buchner, se lavo con 5 mL de hexano, se deja secar al aire sobre papel de filtro y se repite el proceso descrito anteriormente.

Estas reacciones de reutilización se repitieron 5 veces con el mismo derivado inmovilizado.

#### **6.4.2.2.1.3. Resolución cinética dinámica de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol (29) por combinación de lipasa de *Pseudomonas stutzeri* y el catalizador de Shvo.**

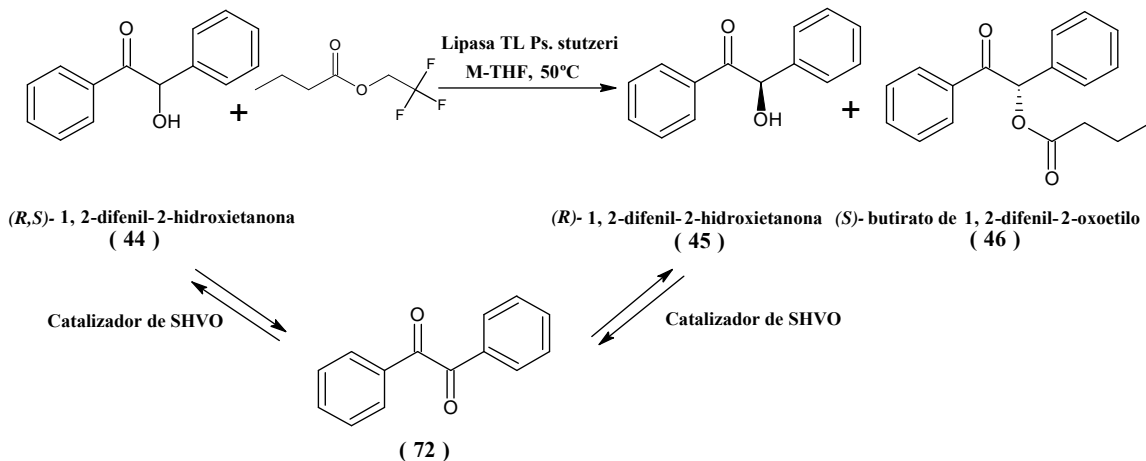
En un matraz de 5 mL, se añadieron 200 mg del derivado inmovilizado poli(BGMPMA-co-EGDMA)-8 (3.12 mg de enzima, 87U $\text{mg}^{-1}$ ), 0.4 mmol de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol (48  $\mu\text{l}$ ), 1.2 mmol de butirato de trifluoroetilo (182  $\mu\text{l}$ ), 0.02 mmol del catalizador de Shvo (20 mg) y 1.5 mL de hexano. A continuación se sigue el protocolo descrito en el apartado 6.4.2.2.1.1.

##### **6.4.2.2.1.3.1. Reutilización de la lipasa de *Pseudomonas stutzeri* inmovilizada sobre poli(GMA-co-HDDMA)-2 en la resolución cinética dinámica de (*R, S*)-1-fenil-1-etanol (29).**

Se llevó a cabo siguiendo el procedimiento experimental descrito anteriormente en este apartado. A continuación, el derivado inmovilizado se filtró en un embudo buchner, se lavo con 5 mL de hexano, se deja secar al aire sobre papel de filtro y se repite el proceso descrito anteriormente. Estas reacciones de reutilización se repitieron 5 veces con el mismo derivado inmovilizado.

### 6.4.2.2.2. Resolución cinética dinámica de (*R*, *S*)-1,2-difenil-2-hidroxi-etanona (44) por combinación de lipasa de *Pseudomonas stutzeri* y el catalizador de Shvo.

Estos experimentos se llevaron a cabo siguiendo el esquema de reacción 73 representado a continuación:



**Esquema 73.** Resolución cinética dinámica de (*R*, *S*)-1,2-difenil-2-hidroxi-etanona (44) por combinación de lipasas y el catalizador de Shvo.

En un matraz de 5 mL, se añadieron 200 mg del derivado inmovilizado poli(GMA-*co*-HDDMA)-2 (3.12 mg de enzima, 87Umg<sup>-1</sup>), 0.094 mmol de (*R*, *S*)-1,2-difenil-2-hidroxi-etanona (20 mg), 0.3 mmol de butirato de trifluoroetilo (46 μl), 0.01 mmol del catalizador de Shvo (10 mg) y 1.5 mL de metil-tetrahidrofurano. A continuación se repitió el procedimiento descrito en el apartado 6.4.2.2.1.

#### 6.4.2.2.2.1. Reutilización de la lipasa de *Pseudomonas stutzeri* inmovilizada sobre poli(GMA-*co*-HDDMA)-2 en la resolución cinética dinámica (*R*, *S*)-1,2-difenil-2-hidroxi-etanona.

Se llevó a cabo siguiendo el procedimiento experimental descrito anteriormente en el apartado 6.4.2.2.1.1.1. Estas reacciones de reutilización se repitieron 5 veces con el mismo derivado inmovilizado.

## 6.5. Aplicaciones industriales de los biocatalizadores.

### 6.5.1. Resolución cinética de (*R*, *S*)-1,2-difenil-2-hidroxi-etanona empleando la lipasa de *Pseudomonas stutzeri* inmovilizada en poli(GMA-*co*-HDDMA)-2 en un reactor tipo tanque.

En un matraz de 50 mL, con tapón, se pesaron 3 g del derivado inmovilizado poli(GMA-*co*-HDDMA)-2 (46.8 mg de enzima, 87Umg<sup>-1</sup>) y se introdujo un imán agitador. A continuación

se añadieron 10 mL de metil-tetrahidrofurano (HPLC), 0.47 mmol de (R, S)-1,2-difenil-2-hidroxi-etanona (100 mg) y 1.5 mmol de butirato de vinilo (114  $\mu$ l). Se agitó magnéticamente la mezcla de reacción a temperatura ambiente, 200 r.p.m. durante 4 horas. Para analizar el progreso de la reacción, se tomaron alícuotas de 40  $\mu$ l a diferentes tiempos de reacción (15, 30, 60, 90, 120 y 240 minutos), a las que se añadieron sobre 1 mL de hexano. Esta solución se filtró a través de filtros Miles<sup>®</sup>-GV, PVDF de tamaño de poro de 0.22  $\mu$ m con el fin de eliminar posibles restos de enzima, y el disolvente se evaporó a vacío para eliminar los disolventes que puedan dañar la columna quiral de HPLC. Cada muestra se disolvió de nuevo en 1 mL de *n*-hexano/2-propanol (50/50, (v/v)) y fueron analizadas mediante HPLC (*n*-hexano: 2-propanol, 90:10; Flujo 1 mL/min; columna quiral Chiralcel OD<sup>®</sup>,  $\lambda_{\text{max.}}$  = 246 nm).

### **6.5.2. Resolución cinética de (R, S)-1,2-difenil-2-hidroxi-etanona empleando la lipasa de *Pseudomonas stutzeri* inmovilizada en poli(GMA-co-HDDMA)-2 en un reactor tipo columna.**

En una columna de cromatografía (30x1cm) se empaquetaron 3 g del derivado inmovilizado poli(GMA-co-HDDMA)-2 (46.8 mg de enzima, 87Umg<sup>-1</sup>) empleando como disolvente metil-tetrahidrofurano, obteniéndose una longitud de 21 centímetros de relleno. A continuación se cargó en la columna 10 mL de una disolución de 0.47 mmol de (R, S)-1,2-difenil-2-hidroxi-etanona (100 mg) y 1.5 mmol de butirato de vinilo (114  $\mu$ l) en metil-tetrahidrofurano. Posteriormente se aplicó presión a la columna con ayuda de un compresor (típico de los empleados en columna cromatográficas). Una vez que se fijaron los 10 mL de mezcla de reacción, se añadió a la columna 30 mL de metil-tetrahidrofurano y se continuó con el proceso de resolución.

El proceso de resolución se siguió recogiendo fracciones de 1mL, de cada fracción se tomó una alícuota de 40  $\mu$ l a las que se añadieron sobre 1 mL de hexano. Esta solución se filtró a través de filtros Miles<sup>®</sup>-GV, PVDF de tamaño de poro de 0.22  $\mu$ m con el fin de eliminar posibles restos de enzima, y el disolvente se evaporó a vacío para eliminar los disolventes que puedan dañar la columna quiral de HPLC. Cada muestra se disolvió de nuevo en 1 mL de *n*-hexano/2-propanol (50/50, (v/v)) y fueron analizadas mediante HPLC (*n*-hexano: 2-propanol, 90:10; Flujo 1 mL/min; columna quiral Chiralcel OD<sup>®</sup>,  $\lambda_{\text{max.}}$  = 246 nm).





## Capítulo VII

# *Conclusiones*

---



## 7. CONCLUSIONES

1. Se sintetizaron una serie de monómeros (alquílicos, metacrílicos y arílicos) funcionalizados con diferente grado de epoxidación, de los que se han preparado por primera vez : 2-alíl-1,3-diglicidil glicerol éter (**3**),  $\{2,2\text{-bis}[(\text{glicidiloxi})\text{metil}]\text{propil}\}$  metacrilato (**12**), triglicidil pentaeritritil metacrilato (**13**),  $p\text{-}\{2,2\text{-bis}[(\text{glicidiloxi})\text{metil}]\text{propanoxi}\}$  metil} estireno (**17**) y  $p\text{-}[(\text{triglicidilpentaeritrox})\text{metil}]$  estireno (**18**).

2. Se ha obtenido una batería de nuevos soportes poliméricos con diferente grado de hidrofiliidad, funcionalizados con grupos epóxido, que poseen un tamaño de poro entre 20 y 30 nm y una superficie específica entre 20 y 300 m<sup>2</sup> / g, llevando a cabo una serie de reacciones de polimerización en las que se variaron los siguientes de parámetros: porcentajes relativos de monómero / agente de entrecruzamiento, naturaleza del agente de entrecruzamiento, naturaleza y proporción del iniciador radicalario y rango de temperatura de polimerización.

3. De las diferentes variables empleadas en las polimerizaciones podemos concluir:

- a) La proporción de monómero y de agente de entrecruzamiento, en la mezcla de polimerización, que da lugar a polímeros con mejores propiedades texturales varía según la naturaleza del monómero y del agente de entrecruzamiento.
- b) El iniciador radicalario que originó polímeros con mejores propiedades texturales fue el AIBN (1-10%). El P.B. dio lugar a polímeros con menor tamaño de poro y mayor superficie específica que el AIBN, y el TEMPO originó polímeros no porosos.
- c) La temperatura de polimerización que dio lugar a polímeros con mejores propiedades texturales varía según la naturaleza del monómero y del agente de entrecruzamiento.
- d) La introducción de una agente surfactante en la mezcla de polimerización no permitió mejorar las propiedades texturales de los polímeros, excepto en el caso del poli(AGE-co-DVB).

4. Analizando los resultados obtenidos en los distintos grupos de polimerización podemos concluir:

- h) El grupo de polimerización que da lugar a los polímeros con mejores propiedades texturales es el resultante de polimerizar los monómeros alquioxiranos con un agente de entrecruzamiento arílico (DVB) (tamaño de poro: 24-26 nm y superficie específica: 100-240 m<sup>2</sup> / g), sin embargo, los rendimientos de reacción obtenidos son bajos (41-55%). A continuación estarían los polímeros originados a partir de monómeros ariloxiranos, metacriloxiranos, y por último los resultantes de polimerizar los monómeros alquioxiranos con una mezcla de agentes de entrecruzamiento, alquílico (DAPE) y arílico (DVB).

- i) La introducción de un agente de entrecruzamiento alquílico (DAPE) en el grupo de polimerización de monómeros alquílicos con DVB, con el objetivo de aumentar la hidrofiliidad de dichos polímeros, origina peores rendimientos de reacción (34-38%) y polímeros con menor tamaño de poro (19-22 nm) y mayor superficie específica (190-330 m<sup>2</sup>/g).
  - j) El grupo de polimerización resultante de polimerizar los monómeros metacriloxiranos con agentes de entrecruzamiento metacrílico origina polímeros con mayor tamaño de poro (25-30 nm) y menor superficie específica (27-45 m<sup>2</sup>/g) que el mejor grupo. Sin embargo, da lugar a excelentes rendimientos de reacción (84-97%).
  - k) La introducción de un monómero metacrílico funcionalizado con un grupo hidroxilo en el grupo de polimerización de monómeros metacrílicos, con el objetivo de aumentar la hidrofiliidad de dichos polímeros, da lugar a polímeros con menor tamaño poro (25-27 nm) y menor superficie específica (22-34 m<sup>2</sup>/g).
  - l) La introducción de un monómero metacrílico funcionalizado con un grupo amino en el grupo de polimerización de monómeros metacrílicos, con el objetivo de aumentar la capacidad de intercambio iónico de dichos polímeros, da lugar generalmente a polímeros con menor tamaño poro (22-31 nm) y menor superficie específica (17-38 m<sup>2</sup>/g).
  - m) La introducción de monómeros metacrílicos, funcionalizados con un grupo hidroxilo y un grupo amino, en el grupo de polimerización de monómeros metacrílicos, da lugar generalmente a polímeros con mayor tamaño poro (23-31 nm) y mayor superficie específica (51-53 m<sup>2</sup>/g).
  - n) El grupo de polimerización resultante de polimerizar los monómeros ariloxiranos con un agente de entrecruzamiento arílico (DVB) da lugar a polímeros con menor tamaño de poro (22-24 nm) y menor superficie específica (39-74 m<sup>2</sup>/g) que el mejor grupo, sin embargo, origina excelentes rendimientos de reacción (91-97%).
5. Se caracterizaron los soportes poliméricos sintetizados seleccionados para llevar a cabo la inmovilización-estabilización de enzimas.
6. Se han obtenido nuevos biocatalizadores con una elevada carga enzimática (12-48 mg enzima / g polímero) y una excelente estabilidad térmica, mediante la inmovilización-estabilización de diferentes enzimas (glicosidasas y lipasas) sobre los soportes poliméricos sintetizados. En todos los casos, se han mejorado tanto las cargas enzimáticas como las estabilidades térmicas, obtenidas empleando un soporte comercial, el Eupergit C.
- De las enzimas con las que se ha trabajado en esta Memoria, no se ha logrado obtener biocatalizadores activos con las glicosidasas, excepto con la β-galactosidasa de *Bacillus circulans*.

7. Los diferentes biocatalizadores obtenidos han sido aplicados eficientemente, como metodología sostenible, en la síntesis regioselectiva de carbohidratos de interés biológico y, en la resolución cinética y cinética dinámica de diferentes alcoholes secundarios intermedios de productos con interés terapéutico.

8. En la síntesis enzimática de *N*-acetil-lactosamina con  $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans*, el empleo de la enzima inmovilizada aumenta la regioselectividad (de 89% al 100% de regioselectividad) y la productividad del proceso (de 1 a 3.7  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  enzima hora). A su vez, hace posible la reutilización del biocatalizador hasta en 20 ciclos, con pérdidas de actividad entre el 16% y el 20%, dependiendo del medio de reacción empleado.

La utilización de disolventes sostenibles permitió mejorar, en algunos casos, tanto el rendimiento como la productividad de la reacción, y por tanto la eficiencia del proceso.

9. En la resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-1-etanol y sus derivados utilizando tres lipasas diferentes, el empleo de las enzimas inmovilizadas aumenta, en mayor o menor medida, la velocidad de la reacción y por tanto la productividad del proceso. A su vez, hace posible la reutilización del biocatalizador en la resolución cinética de (*R*, *S*)-1-fenil-1-etanol, hasta en 30 ciclos, con pérdidas de actividad entre el 17% y el 48%, dependiendo del biocatalizador empleado.

Se ha conseguido resolver eficientemente las mezclas racémicas de los cinco sustratos derivados de (*R*, *S*)-1-fenil-1-etanol (rendimiento > 95%, e.e. > 99%) con uno o varios de los biocatalizadores obtenidos en esta Memoria.

La utilización de disolventes sostenibles no permitió obtener ningún beneficio en el proceso, debido a una disminución de la velocidad de reacción (disolventes derivados de biomasa) o una pérdida de enantioselectividad del proceso (líquidos iónicos).

10. En la resolución cinética de (*R*, *S*)-1,2-diaril-2-hidroxietanonas con la lipasa de *Pseudomonas stutzeri*, el empleo de la enzima inmovilizada aumenta la productividad del proceso. A su vez, hace posible la reutilización del biocatalizador en la resolución cinética de (*R*, *S*)-1,2-difenil-2-hidroxicetona, hasta en 15 ciclos, con pérdidas de actividad entre el 30% y el 90%, dependiendo del medio de reacción empleado.

Se ha conseguido resolver eficientemente las mezclas racémicas de nueve (*R*, *S*)-1,2-diaril-2-hidroxietanonas (rendimiento > 94%, e.e. > 99%) con el biocatalizador obtenido en esta Memoria.

La utilización de disolventes sostenibles no permitió obtener ningún beneficio en el proceso debido a una disminución de la velocidad de reacción.

11. En la resolución cinética dinámica de (*R*, *S*)-1-fenil-1-etanol con tres lipasas diferentes, el empleo de las enzimas inmovilizadas permitió resolver eficientemente la mezcla racémica obteniendo buenos rendimientos (90-95%) y excelentes excesos enantioméricos (> 99%). A su

vez, hace posible la reutilización del biocatalizador hasta en 5 ciclos, con pérdidas de actividad entre el 20% y el 40%, dependiendo del biocatalizador empleado.

**12.** En la resolución cinética dinámica de (*R, S*)-1,2-difenil-2-hidroxicetona con la lipasa de *Pseudomonas stutzeri*, el empleo de la enzima inmovilizada permitió resolver eficientemente la mezcla racémica obteniendo un rendimiento de 95% y un exceso enantiomérico superior al 99%. A su vez, hace posible la reutilización del biocatalizador hasta en 5 ciclos, con una pérdida de actividad del 20%.

## Capítulo VIII

# *Bibliografía*

---

---





## 8. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Sheldon, R. A. *Pure Appl. Chem.* **2000**, 72, 1233.
- (2) Sheldon, R. A.; van, R. F. *Aust. J. Chem.* **2004**, 57, 281.
- (3) Schoemaker, H. E.; Mink, D.; Wubbolts, M. G. *Science* **2003**, 299, 1694.
- (4) Carothers, W. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1929**, 51, 2548.
- (5) Flory, P. J. *Principles of Polymer Chemistry*; Cornell Univ. Press, **1953**.
- (6) Mahadevan, V.; Santhappa, M. *Makromol. Chem.* **1955**, 16, 119.
- (7) Talamini, G.; Vidotto, G. *Makromol. Chem.* **1962**, 53, 21.
- (8) Ringsdorf, H. *Encycl. Polym. Sci. Technol.* **1964**, 2, 642.
- (9) Wohl, M. H. *Chem. Eng.* **1966**, 73, 60.
- (10) Thayer, D. S.; Bulk polymerization process. US3349070, **1967**.
- (11) Ma, S.; Song, G.; Zhong, L.; Tang, G. *J. Appl. Polym. Sci.* **2010**, 116, 3127.
- (12) Bera, O.; Radicevic, R.; Stoilkovic, D.; Jovicic, M.; Pavlicevic, J. *Polym. J.* **2011**, 43, 826.
- (13) Teyssandier, F.; Love, B. J. *J. Appl. Polym. Sci.* **2011**, 120, 1367.
- (14) Uyar, T.; Rusa, M.; Tonelli, A. E. *Macromol. Rapid Commun.* **2004**, 25, 1382.
- (15) Levkin, P. A.; Svec, F.; Frechet, J. M. J. *Adv. Funct. Mater.* **2009**, 19, 1993.
- (16) Hemstroem, P.; Nordborg, A.; Irgum, K.; Svec, F.; Frechet, J. M. J. *J. Sep. Sci.* **2006**, 29, 25.
- (17) Svec, F.; Frechet, J. M. J. *J. Chromatogr., A* **1995**, 702, 89.
- (18) Harkins, W. D. *J Am Chem Soc* **1947**, 69, 1428.
- (19) Smith, W. V. *J Am Chem Soc* **1948**, 70, 3695.
- (20) Damge, C.; Vonderscher, J.; Marbach, P.; Pinget, M. *J Pharm Pharmacol* **1997**, 49, 949.
- (21) Fowler, C. I.; Jessop, P. G.; Cunningham, M. F. *Macromolecules* **2012**, 45, 2955.
- (22) Crosswell, R. W.; Becker, C. H. *J Pharm Sci* **1974**, 63, 440.
- (23) Jayakrishnan, A.; Thanoo, B. C. *J Biomed Mater Res* **1990**, 24, 913.
- (24) Lewis, S. P.; Henderson, L. D.; Chandler, B. D.; Parvez, M.; Piers, W. E.; Collins, S. *J Am Chem Soc* **2005**, 127, 46.
- (25) Islam, M. S.; Yeum, J. H.; Das, A. K.; *J. Colloid Interface Sci.* **2012**, 368, 400.
- (26) Royer, G. P. *Catal. Rev. - Sci. Eng.* **1980**, 22, 29.
- (27) Klibanov, A. M. *Science* **1983**, 219, 722.
- (28) Rosevear, A. *J. Chem. Technol. Biotechnol., Biotechnol.* **1984**, 34B, 127.
- (29) Martinek, K.; Mozhaev, V. V. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1985**, 57, 179.
- (30) Chibata, I.; Tosa, T.; Sato, T. *J. Mol. Catal.* **1986**, 37, 1.
- (31) Taylor, R. F.; Editor *Bioprocess Technology, Vol. 14: Protein Immobilization: Fundamentals and Applications*; Marcel Dekker, Inc., **1991**.
- (32) Katchalski-Katzir, E. *Trends Biotechnol.* **1993**, 11, 471.
- (33) Arroyo, M. *Ars Pharmaceutica* **1998**, 39, 23.
- (34) Guisan, J. M.; Editor *Immobilization of Enzymes and Cells. [In: Methods Biotechnol.; 2006, 22]*; Humana Press Inc., **2006**.
- (35) Sheldon, R. A. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, 349, 1289.
- (36) Stoykova, L. I.; Glick, M. C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, 217, 777.
- (37) Matoba, S.; Tsuneda, S.; Saito, K.; Sugo, T. *Bio/Technology* **1995**, 13, 795.
- (38) Dinnella, C.; Doria, M.; Laus, M.; Lanzarini, G. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1996**, 23, 133.
- (39) Venancio, A.; Almeida, C.; Teixeira, J. A. *J Chromatogr B Biomed Appl* **1996**, 680, 131.
- (40) Yu, S.; Christensen, T. M. I. E.; Kragh, K. M.; Bojsen, K.; Marcussen, J. *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1997**, 1339, 311.
- (41) Garg, N.; Galaev, I. Y.; Mattiasson, B. *Isol. Purif.* **1997**, 2, 301.
- (42) Tomandl, J.; Glatz, Z.; Janiczek, O.; Konecny, P.; Marek, A.; Lachema, CZ281769B6, **1997**.

- (43) Mattiasson, B.; Dainyak, M. B.; Galaev, I. Y. *Polym.-Plast. Technol. Eng.* **1998**, *37*, 303.
- (44) Roy, I.; Sardar, M.; Gupta, M. N. *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, *27*, 53.
- (45) Kumar, A.; Bansal, V.; Andersson, J.; Roychoudhury, P. K.; Mattiasson, B. *J. Chromatogr., A* **2006**, *1103*, 35.
- (46) Jain, S.; Mondal, K.; Gupta, M. *Artif. Cells, Blood Substitutes, Biotechnol.* **2006**, *34*, 127.
- (47) Lin, W.; Skinner, C. D. *J. Sep. Sci.* **2009**, *32*, 2642.
- (48) Basso, A.; Braiuca, P.; Ebert, C.; Gardossi, L.; Linda, P. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2006**, *81*, 1626.
- (49) Johannsen, I.; Gavelin, P.; Versamatrix A/S, WO2006021217A1, **2006**.
- (50) Pittman, C. U., Jr. *Polym. News* **2003**, *28*, 350.
- (51) Nishiguchi, S.; Toda, A.; Nishimura, S.; Yamada, K.; Toyobo Co., JP2004329117A, **2004**.
- (52) Nishimura, S.; Hinou, H.; Fumoto, M.; National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Japan; Shionogi & Co., WO2006030840A1, **2006**.
- (53) Meldal, M. P.; Carlsberg A/S, US5352756A, **1994**.
- (54) Nishimura, S.-I.; In *Solution and polymer-supported synthesis of carbohydrates* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: **2003**; Vol. 1, p 129.
- (55) Yan, F.; Wakarchuk, W. W.; Gilbert, M.; Richards, J. C.; Whitfield, D. M. *Carbohydr. Res.* **2000**, *328*, 3.
- (56) Fumoto, M.; Hinou, H.; Matsushita, T.; Kurogochi, M.; Ohta, T.; Ito, T.; Yamada, K.; Takimoto, A.; Kondo, H.; Inazu, T.; Nishimura, S.-I. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 2534.
- (57) Fumoto, M.; Hinou, H.; Ohta, T.; Ito, T.; Yamada, K.; Takimoto, A.; Kondo, H.; Shimizu, H.; Inazu, T.; Nakahara, Y.; Nishimura, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11804.
- (58) Zehavi, U. *React. Funct. Polym.* **1999**, *41*, 59.
- (59) Gorchs, O.; Hernandez, M.; Garriga, L.; Pedroso, E.; Grandas, A.; Farras, J. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 1827.
- (60) Kadokura, M.; Wada, T.; Seio, K.; Moriguchi, T.; Huber, J.; Luhrmann, R.; Sekine, M. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 8853.
- (61) Poijaarvi, P.; Heinonen, P.; Virta, P.; Loennberg, H. *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 1564.
- (62) Seliger, H. H.; Groeger, G.; Boehringer Mannheim G.m.b.H., DE3801987A1, **1989**.
- (63) Grether, U.; Waldmann, H. *Chem.--Eur. J.* **2001**, *7*, 959.
- (64) Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook*; Springer, **2011**.
- (65) Griengl, H.; Schwab, H.; Fechter, M. *Trends Biotechnol.* **2000**, *18*, 252.
- (66) Effenberger, F.; Forster, S.; Wajant, H. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 532.
- (67) Dominguez, d. M. P.; Stillger, T.; Pohl, M.; Wallert, S.; Drauz, K.; Groeger, H.; Trauthwein, H.; Liese, A. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, *38*, 43.
- (68) Faber, K.; Patel, R. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 517.
- (69) Loughlin, W. A. *Bioresour. Technol.* **2000**, *74*, 49.
- (70) Alcalde, M.; Ferrer, M.; Plou, F. J.; Ballesteros, A. *Trends Biotechnol.* **2006**, *24*, 281.
- (71) Schmid, A.; Hollmann, F.; Park, J. B.; Buhler, B. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 359.
- (72) Ran, N.; Zhao, L.; Chen, Z.; Tao, J. *Green Chem.* **2008**, *10*, 361.
- (73) Lee, M.-Y.; Dordick, J. S. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 376.
- (74) Gupta, M. N.; Roy, I. *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271*, 2575.
- (75) Mateo, C.; Palomo, J. M.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J. M.; Fernandez-Lafuente, R. *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 1451.
- (76) Bornscheuer, U. T.; Pohl, M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 137.
- (77) Berglund, P. *Biomol. Eng.* **2001**, *18*, 13.
- (78) Bornscheuer, U. T. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 543.
- (79) Reetz, M. T.; Carballeira, J. D.; Vogel, A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 7745.

- (80) Taglieber, A.; Hobenreich, H.; Carballeira, J. D.; Mondiere, R. J. G.; Reetz, M. T. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 8597.
- (81) Reetz, M. T.; Carballeira, J. D. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 891.
- (82) Barsch, S.; Kourist, R.; Bornscheuer, U. T. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 1508.
- (83) Schmid, R. D.; Verger, R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, *37*, 1609.
- (84) Roberts, S. M. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **2000**, 611.
- (85) Gotor-Fernandez, V.; Brieva, R.; Gotor, V. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, *40*, 111.
- (86) Cygler, M.; Grochulski, P.; Kazlauskas, R. J.; Schrag, J. D.; Bouthillier, F.; Rubin, B.; Serreqi, A. N.; Gupta, A. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3180.
- (87) Kazlauskas, R. J.; Weissfloch, A. N. E.; Rappaport, A. T.; Cuccia, L. A. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2656.
- (88) Norin, M.; Haeffner, F.; Achour, A.; Norin, T.; Hult, K. *Protein Sci.* **1994**, *3*, 1493.
- (89) Sasaki, A.; Ishimizu, T.; Geyer, R.; Hase, S. *FEBS J.* **2005**, *272*, 1660.
- (90) Daines, A. M.; Maltman, B. A.; Flitsch, S. L. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 106.
- (91) Koeller, K. M.; Wong, C.-H. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4465.
- (92) Gijzen, H. J. M.; Qiao, L.; Fitz, W.; Wong, C.-H. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 443.
- (93) Wymer, N.; Toone, E. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 110.
- (94) Blanchard, J. E.; Withers, S. G. *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 627.
- (95) Kirchner, G.; Scollar, M. P.; Klibanov, A. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7072.
- (96) Kitaguchi, H.; Fitzpatrick, P. A.; Huber, J. E.; Klibanov, A. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3094.
- (97) Gonzalez-Sabin, J.; Lavandera, I.; Rebolledo, F.; Gotor, V. *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 1264.
- (98) Gotor, V. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2189.
- (99) Alfonso, I.; Gotor, V. *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 201.
- (100) Bjoerkling, F.; Godtfredsen, S. E.; Kirk, O. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1990**, 1301.
- (101) Gotor, V.; Astorga, C.; Rebolledo, F. *Synlett* **1990**, 387.
- (102) Gotor, V. In *Microbial Reagents in Organic Synthesis*; Servi, S., Ed. **1992**; Vol. 381, p 199.
- (103) Silver, M. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 4247.
- (104) Bornscheuer, U. T.; Kazlauskas, R. J. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 6032.
- (105) O'Brien, P. J. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 720.
- (106) Yoshikuni, Y.; Ferrin, T. E.; Keasling, J. D. *Nature* **2006**, *440*, 1078.
- (107) Hult, K.; Berglund, P. *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 231.
- (108) Magnusson, A. O.; Takwa, M.; Hamberg, A.; Hult, K. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 4582.
- (109) Bocola, M.; Otte, N.; Jaeger, K.-E.; Reetz, M. T.; Thiel, W. *ChemBioChem* **2004**, *5*, 214.
- (110) Carballeira, J. D.; KrumLinde, P.; Bocola, M.; Vogel, A.; Reetz, M. T.; Baeckvall, J.-E. *Chem. Commun.* **2007**, 1913.
- (111) Reetz, M. T.; Bocola, M.; Carballeira, J. D.; Zha, D.; Vogel, A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 4192.
- (112) Reetz, M. T.; Puls, M.; Carballeira, J. D.; Vogel, A.; Jaeger, K.-E.; Eggert, T.; Thiel, W.; Bocola, M.; Otte, N. *ChemBioChem* **2007**, *8*, 106.
- (113) Torre, O.; Alfonso, I.; Gotor, V. *Chemical Communications* **2004**, 1724.
- (114) Branneby, C.; Carlqvist, P.; Magnusson, A.; Hult, K.; Brinck, T.; Berglund, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 874.
- (115) Ohno, M.; Otsuka, M. *Org. React.* **1989**, *37*, 1.
- (116) Santaniello, E.; Ferraboschi, P.; Grisenti, P.; Manzocchi, A. *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 1071.
- (117) Schulz, M.; Kluge, R.; Schuessler, M.; Hoffmann, G. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 3175.
- (118) Ghanem, A.; Aboul-Enein, H. Y. *Chirality* **2005**, *17*, 1.
- (119) Ema, T. *Curr. Org. Chem.* **2004**, *8*, 1009.
- (120) Sih, C. J.; Wu, S. H. *Top. Stereochem.* **1989**, *19*, 63.
- (121) Bornscheuer, U.; Kazlauskas, R. *Hydrolases in Organic Synthesis: Regio- or Stereoselective Biotransformations*; Wiley, **1999**.

- (122) Ward, R. S. *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 1475.
- (123) Sturmer, R. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1173.
- (124) Dinh, P. M.; Howarth, J. A.; Hudnott, A. R.; Williams, J. M. J.; Harris, W. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 7623.
- (125) Larsson, A. L. E.; Persson, B. A.; Backvall, J.-E. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1211.
- (126) Persson, B. A.; Larsson, A. L. E.; Le, R. M.; Baeckvall, J.-E. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1645.
- (127) Shvo, Y.; Czarkie, D.; Rahamim, Y.; Chodosh, D. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 7400.
- (128) Karvembu, R.; Prabhakaran, R.; Natarajan, K. *Coord. Chem. Rev.* **2005**, *249*, 911.
- (129) Huerta, F. F.; Laxmi, Y. R. S.; Baeckvall, J.-E. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1037.
- (130) Kim, M.-J.; Choi, Y. K.; Choi, M. Y.; Kim, M. J.; Park, J. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 4736.
- (131) Pamies, O.; Baeckvall, J.-E. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 9006.
- (132) Hennen, W. J.; Sweers, H. M.; Wang, Y. F.; Wong, C. H. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 4939.
- (133) Choi, J. H.; Kim, Y. H.; Nam, S. H.; Shin, S. T.; Kim, M.-J.; Park, J. *Angew Chem Int Ed Engl* **2002**, *41*, 2373.
- (134) Choi, J. H.; Choi, Y. K.; Kim, Y. H.; Park, E. S.; Kim, E. J.; Kim, M.-J.; Park, J. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 1972.
- (135) Csjernyik, G.; Bogar, K.; Baeckvall, J.-E. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 6799.
- (136) Martin-Matute, B.; Baeckvall, J.-E. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 9191.
- (137) Martin-Matute, B.; Edin, M.; Bogar, K.; Kaynak, F. B.; Baeckvall, J.-E. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8817.
- (138) Azerad, R.; Buisson, D. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 565.
- (139) Kim, K. J.; Howard, A. J. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2002**, *58*, 1332.
- (140) Pamies, O.; Backvall, J.-E. *Trends Biotechnol.* **2004**, *22*, 130.
- (141) Martín Matute, B. *Anales de la Real Sociedad Española de Química* **2006**, *102*, 46.
- (142) Martín-Matute, B.; Bäckvall, J.-E. *Current Opinion in Chemical Biology* **2007**, *11*, 226.
- (143) Pellissier, H. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 1563.
- (144) Edin, M.; Martin-Matute, B.; Baeckvall, J.-E. *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 708.
- (145) Martin-Matute, B.; Edin, M.; Baeckvall, J.-E. *Chem.--Eur. J.* **2006**, *12*, 6053.
- (146) Paetzold, J.; Bäckvall, J. E. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 17620.
- (147) Hoben, C. E.; Kanupp, L.; Bäckvall, J.-E. *Tetrahedron Letters* **2008**, *49*, 977.
- (148) Ahn, Y.; Ko, S.-B.; Kim, M.-J.; Park, J. *Coordination Chemistry Reviews* **2008**, *252*, 647.
- (149) Kamal, A.; Azhar, M. A.; Krishnaji, T.; Malik, M. S.; Azeza, S. *Coordination Chemistry Reviews* **2008**, *252*, 569.
- (150) Lee, D.; Huh, E. A.; Kim, M.-J.; Jung, H. M.; Koh, J. H.; Park, J. *Organic Letters* **2000**, *2*, 2377.
- (151) Riermeier, T. H.; Gross, P.; Monsees, A.; Hoff, M.; Trauthwein, H. *Tetrahedron Letters* **2005**, *46*, 3403.
- (152) Kim, N.; Ko, S.-B.; Kwon, M. S.; Kim, M.-J.; Park, J. *Organic Letters* **2005**, *7*, 4523.
- (153) Rizzi, M.; Stylos, P.; Riek, A.; Reuss, M. *Enzyme and Microbial Technology* **1992**, *14*, 709.
- (154) Ziffer, H.; Kawai, K.; Kasai, M.; Imuta, M.; Froussios, C. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 3017.
- (155) Kasai, M.; Kawai, K.; Imuta, M.; Ziffer, H. *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 675.
- (156) Orrenius, C.; Oehrner, N.; Rotticci, D.; Mattson, A.; Hult, K.; Norin, T. *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 1217.
- (157) Borreguero, I.; Sinisterra, J. V.; Rumbero, A.; Hermoso, J. A.; Martínez-Ripoll, M.; Alcantara, A. R. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 14961.
- (158) Jing, Q.; Kazlauskas, R. J. *Chirality* **2008**, *20*, 724.
- (159) Ema, T. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 2765.

- (160) Gupta, A. K.; Kazlauskas, R. J. *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4*, 879.
- (161) Shimizu, M.; Kawanami, H.; Fukisawa, T. *Chem. Lett.* **1992**, 107.
- (162) Schrag, J. D.; Li, Y.; Cygler, M.; Lang, D.; Burgdorf, T.; Hecht, H.-J.; Schmid, R.; Schomburg, D.; Rydel, T. J.; et al. *Structure* **1997**, *5*, 187.
- (163) Uppenberg, J.; Oehrner, N.; Norin, M.; Hult, K.; Kleywegt, G. J.; Patkar, S.; Waagen, V.; Anthonsen, T.; Jones, T. A. *Biochemistry* **1995**, *34*, 16838.
- (164) Rotticci, D.; Haeffner, F.; Orrenius, C.; Norin, T.; Hult, K. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1998**, *5*, 267.
- (165) Orrenius, C.; Haeffner, F.; Rotticci, D.; Oehrner, N.; Norin, T.; Hult, K. *Biocatal. Biotransform.* **1998**, *16*, 1.
- (166) Raza, S.; Fransson, L.; Hult, K. *Protein Sci.* **2001**, *10*, 329.
- (167) Ottosson, J.; Fransson, L.; Hult, K. *Protein Sci.* **2002**, *11*, 1462.
- (168) Trodler, P.; Pleiss, J. *BMC Structural Biology* **2008**, *8*, 9.
- (169) Nyhlen, J.; Martin-Matute, B.; Sandstroem, A. G.; Bocola, M.; Baeckvall, J.-E. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1968.
- (170) Luic, M.; Tomic, S.; Lescic, I.; Ljubovic, E.; Sepac, D.; Sunjic, V.; Vitale, L.; Saenger, W.; Kojic-Prodic, B. *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 3964.
- (171) Luic, M.; Stefanic, Z.; Ceilinger, I.; Hodosček, M.; Janežič, D.; Lenac, T.; Asler, I. L. i.; Sepac, D.; Tomic, S. *The Journal of Physical Chemistry B* **2008**, *112*, 4876.
- (172) Rotticci, D.; Orrenius, C.; Hult, K.; Norin, T. *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 359.
- (173) Edin, M.; Baeckvall, J.-E. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 2216.
- (174) Mizuguchi, E.; Achiwa, K. *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4*, 2303.
- (175) Hughes, D. L.; Bergan, J. J.; Amato, J. S.; Bhupathy, M.; Leazer, J. L.; McNamara, J. M.; Sidler, D. R.; Reider, P. J.; Grabowski, E. J. J. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 6252.
- (176) Duh, T. H.; Wang, Y. F.; Wu, M. J. *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4*, 1793.
- (177) Gala, D.; DiBenedetto, D. J.; Clark, J. E.; Murphy, B. L.; Schumacher, D. P.; Steinman, M. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 611.
- (178) Adam, W.; Diaz, M. T.; Fell, R. T.; Saha-Moeller, C. R. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 2207.
- (179) Tanyeli, C.; Demir, A. S.; Dikici, E. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 2399.
- (180) Tanyeli, C.; Akhmedov, I. M.; Iyiguen, C. *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 1125.
- (181) Adam, W.; Diaz, M. T.; Saha-Moeller, C. R. *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 791.
- (182) Kajiro, H.; Mitamura, S.-i.; Mori, A.; Hiyama, T. *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 907.
- (183) Scheid, G.; Kuit, W.; Ruijter, E.; Orru, R. V. A.; Henke, E.; Bornscheuer, U.; Wessjohann, L. A. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 1063.
- (184) Jeon, N. Y.; Ko, S.-J.; Lee, Y. S.; Kim, B. T.; Won, K.; Lee, H. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2007**, *48*, 38.
- (185) Demir, A. S.; Hamamci, H.; Tanyeli, C.; Akhmedov, I. M.; Doganel, F. *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 1673.
- (186) Demir, A. S.; Hamamci, H.; Sesenoglu, O.; Aydogan, F.; Capanoglu, D.; Neslihanoglu, R. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 1953.
- (187) Aoyagi, Y.; Agata, N.; Shibata, N.; Horiguchi, M.; Williams, R. M. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 10159.
- (188) Demir, A. S.; Findik, H.; Kose, E. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 777.
- (189) Kato, K.; Gong, Y.; Saito, T.; Yokogawa, Y. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2004**, *30*, 61.
- (190) Zhang, J.; Wu, J.; Yang, L. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2004**, *31*, 67.
- (191) Moore, B. D.; Stevenson, L.; Watt, A.; Flitsch, S.; Turner, N. J.; Cassidy, C.; Graham, D. *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 1133.
- (192) Gill, I. I.; Das, J.; Patel, R. N. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 1330.
- (193) Shoji, M.; Kishida, S.; Takeda, M.; Takeya, H.; Osada, H.; Hayashi, Y. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 9155.
- (194) Aoyagi, Y.; Saitoh, Y.; Ueno, T.; Horiguchi, M.; Takeya, K.; Williams, R. M. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 6899.

- (195) Martinez, I.; Markovits, A.; Chamy, R.; Markovits, A. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2004**, *112*, 55.
- (196) Celebi, N.; Yildiz, N.; Demir, A. S.; CalimLi, A. *J. Supercrit. Fluids* **2007**, *41*, 386.
- (197) Huerta, F. F.; Bäckvall, J.-E. *Organic Letters* **2001**, *3*, 1209.
- (198) Runmo, A.-B. L.; Pàmies, O.; Faber, K.; Bäckvall, J.-E. *Tetrahedron Letters* **2002**, *43*, 2983.
- (199) Kim, M.-J.; Lim, I. T.; Choi, G.-B.; Whang, S.-Y.; Ku, B.-C.; Choi, J.-Y. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1996**, *6*, 71.
- (200) Ödman, P.; Wessjohann, L. A.; Bornscheuer, U. T. *The Journal of Organic Chemistry* **2005**, *70*, 9551.
- (201) Ebbers, E. J.; Ariaans, G. J. A.; Houbiers, J. P. M.; Bruggink, A.; Zwanenburg, B. *ChemInform* **1997**, *28*, no.
- (202) Schnell, B.; Faber, K.; Kroutil, W. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 653.
- (203) Felfer, U.; Goriup, M.; Koegl, M. F.; Wagner, U.; Larissegger-Schnell, B.; Faber, K.; Kroutil, W. *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 951.
- (204) Glueck, S. M.; Larissegger-Schnell, B.; Csar, K.; Kroutil, W.; Faber, K. *Chemical Communications* **2005**, 1904.
- (205) Nestl, B. M.; Glueck, S. M.; Hall, M.; Kroutil, W.; Stuermer, R.; Hauer, B.; Faber, K. *European Journal of Organic Chemistry* **2006**, *2006*, 4573.
- (206) Nestl, B. M.; Kroutil, W.; Faber, K. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 873.
- (207) Nestl, B. M.; Voss, C. V.; Bodlenner, A.; Ellmer-Schaumberger, U.; Kroutil, W.; Faber, K. *Applied Microbiology & Biotechnology* **2007**, *76*, 1001.
- (208) Nestl, B. M.; Bodlenner, A.; Stuermer, R.; Hauer, B.; Kroutil, W.; Faber, K. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 1465.
- (209) Zeng, X.; Yoshino, R.; Murata, T.; Ajisaka, K.; Usui, T. *Carbohydr. Res.* **2000**, *325*, 120.
- (210) Crout, D. H. G.; MacManus, D. A.; Critchley, P. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1990**, 1865.
- (211) Hernaiz, M. J.; Crout, D. H. G. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2000**, *10*, 403.
- (212) Hernaiz, M. J.; Crout, D. H. G. *Enzyme and Microbial Technology* **2000**, *27*, 26.
- (213) Reuter, S.; Rusborg, N. A.; Zimmermann, W. *Enzyme Microb. Technol.* **1999**, *25*, 509.
- (214) Lopez, R.; Fernandez-Mayoralas, A.; Martin-Lomas, M.; Guisan, J. M. *Biotechnol. Lett.* **1991**, *13*, 705.
- (215) Nilsson, K. G. I. *Stud. Org. Chem. (Amsterdam)* **1987**, *29*, 369.
- (216) Bojarova, P.; Kren, V. *Trends Biotechnol.* **2009**, *27*, 199.
- (217) Montero, E.; Alonso, J.; Canada, F. J.; Fernandez-Mayoralas, A.; Martin-Lomas, M. *Carbohydr. Res.* **1998**, *305*, 383.
- (218) Zeleny, R.; Altmann, F.; Praznik, W. *Anal. Biochem.* **1997**, *246*, 96.
- (219) Binder, W. H.; Kaehlig, H.; Schmid, W. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 10407.
- (220) Yoon, J. H.; Ajisaka, K. *Carbohydr Res* **1996**, *292*, 153.
- (221) Giacomini, C.; Irazoqui, G.; Gonzalez, P.; Batista-Viera, F.; Brena, B. M. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2002**, *19-20*, 159.
- (222) Nucci, R.; Moracci, M.; Vaccaro, C.; Vespa, N.; Rossi, M. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1993**, *17*, 239.
- (223) Hartmeier, W. *Trends Biotechnol.* **1985**, *3*, 149.
- (224) Nieder, V.; Marx, S. P.; Gallego, R. G.; Kamerling, J. P.; Vliegenthart, J. F. G.; Elling, L. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2003**, *21*, 157.
- (225) Usui, T.; Morimoto, S.; Hayakawa, Y.; Kawaguchi, M.; Murata, T.; Matahira, Y.; Nishida, Y. *Carbohydr. Res.* **1996**, *285*, 29.
- (226) Vic, G.; Hastings, J. J.; Howarth, O. W.; Crout, D. H. G. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 709.
- (227) Lio, R. G.; Thiem, J. *Carbohydr. Res.* **1999**, *317*, 180.
- (228) Jurado, E.; Camacho, F.; Luzon, G.; Vicaria, J. M. *Enzyme Microb. Technol.* **2004**, *34*, 33.

- (229) Gambert, U.; Lio, R. G.; Farkas, E.; Thiem, J.; Bencomo, V. V.; Liptak, A. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 1285.
- (230) Hedbys, L.; Johansson, E.; Mosbach, K.; Larsson, P. O.; Gunnarsson, A.; Svensson, S. *Carbohydr. Res.* **1989**, *186*, 217.
- (231) Hedbys, L.; Johansson, E.; Mosbach, K.; Larsson, P. O.; Gunnarsson, A.; Svensson, S.; Loenn, H. *Glycoconjugate J.* **1989**, *6*, 161.
- (232) Schroder, S.; Schmidt, U.; Thiem, J.; Kowalczyk, J.; Kunz, M.; Vogel, M. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2601.
- (233) Gambert, U.; Thiem, J. *Carbohydr Res* **1997**, *299*, 85.
- (234) Li, J.; Wang, P. G. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 7967.
- (235) Wingard, L. B., Jr. *Advan. Biochem. Eng.* **1972**, *2*, 1.
- (236) Verger, R. *Trends Biotechnol.* **1997**, *15*, 32.
- (237) Bornscheuer, U. T.; Kazlauskas, R. J. In *Hydrolases in Organic Synthesis*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: **2006**, p 347.
- (238) Reetz, M. T. *Adv. Mater.* **1997**, *9*, 943.
- (239) Fernandez-Lafuente, R.; Armisen, P.; Sabuquillo, P.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J. M. *Chem. Phys. Lipids* **1998**, *93*, 185.
- (240) Petkar, M.; Lali, A.; Caimi, P.; Daminati, M. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, *39*, 83.
- (241) Mingarro, I.; Abad, C.; Braco, L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 3308.
- (242) Lopez-Serrano, P.; Cao, L.; van, R. F.; Sheldon, R. A. *Biotechnol. Lett.* **2002**, *24*, 1379.
- (243) Fernandez-Lorente, G.; Palomo, J. M.; Mateo, C.; Munilla, R.; Ortiz, C.; Cabrera, Z.; Guisan, J. M.; Fernandez-Lafuente, R. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 2610.
- (244) Palomo, J. M.; Fernandez-Lorente, G.; Mateo, C.; Ortiz, C.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J. M. *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, *31*, 775.
- (245) Palomo, J. M.; Segura, R. L.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J. M.; Fernandez-Lafuente, R. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 1157.
- (246) Reetz, M. T.; Tielmann, P.; Wiesenhoefer, W.; Koenen, W.; Zonta, A. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 717.
- (247) Bickerstaff, G. F. *Methods Biotechnol.* **1997**, *1*, 253.
- (248) Wheatley, J. B.; Schmidt, D. E., Jr. *J. Chromatogr., A* **1999**, *849*, 1.
- (249) Katchalski-Katzir, E.; Kraemer, D. M. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2000**, *10*, 157.
- (250) Mateo, C.; Abian, O.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J. M. *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, *26*, 509.
- (251) Mateo, C.; Abian, O.; Fernandez-Lorente, G.; Pedroche, J.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J. M.; Tam, A.; Daminati, M. *Biotechnol. Prog.* **2002**, *18*, 629.
- (252) Kraemer, D. M. L., K.; Pennewiss, H.; Plainer, H. 26th International IUPAC Symposium on Macromolecules, Mainz, Germany, 1979.
- (253) Smalla, K.; Turkova, J.; Coupek, J.; Hermann, P. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1988**, *10*, 21.
- (254) Melander, W. R.; Corradini, D.; Horvath, C. *J. Chromatogr.* **1984**, *317*, 67.
- (255) Hannibal-Friedrich, O.; Chun, M.; Sernetz, M. *Biotechnol. Bioeng.* **1980**, *22*, 157.
- (256) Kraemer, D. M. P., H.; Plainer, H.; Schnee, R.; Schleier, W.; Roehm, US4511694, **1985**.
- (257) Ivanov, A. E.; Edink, E.; Kumar, A.; Galaev, I. Y.; Arendsen, A. F.; Bruggink, A.; Mattiasson, B. *Biotechnol. Prog.* **2003**, *19*, 1167.
- (258) Virnik, A. D.; Skokova, I. F.; Yudanov, T. N.; Ivanova, M. V.; Khomyakov, K. P.; Visotskaya, E. P.; Kostanova, E. A.; Rozenfeld, M. A. *Cellul. Chem. Technol.* **1993**, *27*, 477.
- (259) Dumitriu, S.; Popa, M.; Oniscu, C.; Dumitriu, M. *Cellul. Chem. Technol.* **1985**, *19*, 601.
- (260) Goulart, A. J.; Benedetti, A. C. E. P.; Tavano, O. L.; Marques, D. P.; Contiero, J.; Carmona, E. C.; Monti, R. *Curr. Trends Biotechnol. Pharm.* **2008**, *2*, 462.
- (261) Bolivar, J. M.; Lopez-Gallego, F.; Godoy, C.; Rodrigues, D. S.; Rodrigues, R. C.; Batalla, P.; Rocha-Martin, J.; Mateo, C.; Giordano, R. L. C.; Guisan, J. M. *Enzyme Microb. Technol.* **2009**, *45*, 477.

- (262) Tardioli, P. W.; Vieira, M. F.; Vieira, A. M. S.; Zanin, G. M.; Betancor, L.; Mateo, C.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J. M. *Process Biochem.* **2011**, *46*, 409.
- (263) Nasratun, M.; Hasrul, A. S.; Sureena, A.; Aini, M. A. N.; Ruwaida, A. R.; Shalyda, M. S.; Ideris, A.; Rozaimi, A. S.; Sharifuddin, J. H.; Nordin, N. I. A. A. *J. Appl. Sci.* **2010**, *10*, 2701.
- (264) Wanjari, S.; Prabhu, C.; Yadav, R.; Satyanarayana, T.; Labhsetwar, N.; Rayalu, S. *Process Biochem.* **2011**, *46*, 1010.
- (265) Seo, D.-J.; Jang, Y.-H.; Park, R.-D.; Jung, W.-J. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *88*, 391.
- (266) Watanabe, S.; Shimizu, Y.; Teramatsu, T.; Murachi, T.; Hino, T. *Methods Enzymol.* **1988**, *137*, 545.
- (267) Shanthi, C.; Shelly, D. C.; Stennett, B. *J. Am. Leather Chem. Assoc.* **2003**, *98*, 6.
- (268) Stanley, W. L.; Watters, G. G.; Chan, B. G.; US758897A0, **1977**.
- (269) Kurimoto, A.; Tanabe, T.; Tachibana, A.; Yamauchi, K. *J. Biosci. Bioeng.* **2003**, *96*, 307.
- (270) Elnashar, M. M. M.; Yassin, M. A.; Kahil, T. *J. Appl. Polym. Sci.* **2008**, *109*, 4105.
- (271) Zhang, Y.-T.; Zhi, T.-T.; Zhang, L.; Huang, H.; Chen, H.-L. *Polymer* **2009**, *50*, 5693.
- (272) Manzano, M. F. G.; Igarzabal, C. I. A. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2011**, *72*, 28.
- (273) Veronese, F. M.; Mammucari, C.; Schiavon, F.; Schiavon, O.; Lora, S.; Secundo, F.; Chilin, A.; Guiotto, A. *Farmaco* **2001**, *56*, 541.
- (274) Djennad, M. h.; Benachour, D.; Berger, H.; Schomaecker, R. *Eng. Life Sci.* **2003**, *3*, 446.
- (275) Fernandes, P.; Marques, M. P. C.; Carvalho, F.; Cabral, J. M. S. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2009**, *84*, 561.
- (276) Pifferi, P. G.; Spagna, G.; Nava, R. R.; Setti, L. *Biotechnol. Tech.* **1993**, *7*, 457.
- (277) Heilmann, A.; Teuscher, N.; Kiesow, A.; Janasek, D.; Spohn, U. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2003**, *3*, 375.
- (278) Yu, Y.; Chen, B.; Qi, W.; Li, X.; Shin, Y.; Lei, C.; Liu, J. *Microporous Mesoporous Mater.* **2012**, *153*, 166.
- (279) Jun, S.-H.; Lee, J.; Kim, B. C.; Lee, J. E.; Joo, J.; Park, H.; Lee, J. H.; Lee, S.-M.; Lee, D.; Kim, S.; Koo, Y.-M.; Shin, C. H.; Kim, S. W.; Hyeon, T.; Kim, J. *Chem. Mater.* **2012**, *24*, 924.
- (280) Ma, H.; He, J.; Evans, D. G.; Duan, X. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2004**, *30*, 209.
- (281) Calgaroto, C.; Scherer, R. P.; Calgaroto, S.; Oliveira, J. V.; de, O. D.; Pergher, S. B. C. *Appl. Catal., A* **2011**, *394*, 101.
- (282) Mitchell, S.; Perez-Ramirez, J. *Catal. Today* **2011**, *168*, 28.
- (283) Pluym, B.; Slegers, G.; Claeys, A. *Enzyme Microb. Technol.* **1988**, *10*, 656.
- (284) Janasek, D.; Spohn, U. *Bioforum Int.* **1998**, *2*, 38.
- (285) Dartiguenave, C.; Hamad, H.; Waldron, K. C. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *663*, 198.
- (286) Griffiths, D.; Hall, G. *Trends Biotechnol.* **1993**, *11*, 122.
- (287) Scouten, W. H.; Luong, J. H. T.; Brown, R. S. *Trends Biotechnol.* **1995**, *13*, 178.
- (288) Callegaro, L.; Denti, E. *Int. J. Artif. Organs* **1983**, *6*, 107.
- (289) Danilov, V. S.; Egorov, N. S. *Antibiot. Khimioter.* **1988**, *33*, 304.
- (290) Abbott, B. J. *Adv. Appl. Microbiol.* **1976**, *20*, 203.
- (291) Ariens, E. J. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1984**, *26*, 663.
- (292) Ariens, E. J. *Pharmacol. Toxicol.* **1989**, *64*, 319.
- (293) Margolin, A. L. *Enzyme Microb. Technol.* **1993**, *15*, 266.
- (294) Arroyo, M.; Sinisterra, J. V. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 4410.
- (295) Lalonde, J. J.; Govardhan, C.; Khalaf, N.; Martinez, A. G.; Visuri, K.; Margolin, A. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6845.
- (296) Pitcher, W. H., Jr.; In *Immobilized enzymes for food processing*, CRC: **1980**; pp 15-54.
- (297) Vuillemand, J. C.; Goulet, J.; Amiot, J.; Vijayalakshmi, M. A.; Terre, S. *Enzyme Microb. Technol.* **1988**, *10*, 2.
- (298) Tanaka, A. e. a. In *Industrial Application of immobilized enzymes*; Honda, Y. K., M.; Abiko, K.; Sogo, Y., Ed. **1993**, p 209.
- (299) Germain, P.; Crichton, R. R. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **1988**, *41*, 297.



- (300) Pifferi, P. G.; Spagna, G.; Busetto, L. *J. Mol. Catal.* **1987**, *42*, 137.
- (301) Magee, E. L., Jr.; Olson, N. F.; Lindsay, R. C. *J. Dairy Sci.* **1981**, *64*, 616.
- (302) Nagasawa, T.; Yamada, H. *Trends Biotechnol.* **1989**, *7*, 153.
- (303) Mellor, R. B.; Ronnenberg, J.; Campbell, W. H.; Diekmann, S. *Nature* **1992**, *355*, 717.
- (304) Chibata, I.; Tosa, T. *Trends Biochem. Sci. (Pers. Ed.)* **1980**, *5*, 88.
- (305) Kates, R. W.; Clark, W. C.; Corell, R.; Hall, J. M.; Jaeger, C. C.; Lowe, I.; McCarthy, J. J.; Schellnhuber, H. J.; Bolin, B.; Dickson, N. M.; Faucheux, S.; Gallopin, G. C.; Grubler, A.; Huntley, B.; Jager, J.; Jodha, N. S.; Kasperson, R. E.; Mabogunje, A.; Matson, P.; Mooney, H.; Moore, B., 3rd; O'Riordan, T.; Svedlin, U. *Science* **2001**, *292*, 641.
- (306) Albin, A.; Fagnoni, M. *ChemSusChem* **2008**, *1*, 63.
- (307) Anastas, P. T.; Zimmerman, J. B. *Environ Sci Technol* **2003**, *37*, 94A.
- (308) Horvath, I. T.; Anastas, P. T. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 2167.
- (309) Horvath, I. T.; Anastas, P. T. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 2169.
- (310) Anastas, P.; Warner, J. *Green Chemistry: Theory and Practice*; Oxford Univ Press, **1998**.
- (311) Tucker, J. L. *Org. Process Res. Dev.* **2006**, *10*, 315.
- (312) Capello, C.; Fischer, U.; Hungerbuehler, K. *Green Chem.* **2007**, *9*, 927.
- (313) Jessop, P. G. *Can. Chem. News* **2007**, *59*, 16.
- (314) Stillinger, F. H. *Nature* **1999**, *401*, 850.
- (315) Chanda, A.; Fokin, V. V. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 725.
- (316) Lindstrom, U. M.; Editor *Organic Reactions in Water: Principles, Strategies and Applications*; Blackwell Publishing Ltd., **2007**.
- (317) Hari, K. S. *Biotechnol. Adv.* **2002**, *20*, 239.
- (318) DeSimone, J. M. *Science* **2002**, *297*, 799.
- (319) Hammond, D. A.; Karel, M.; Klivanov, A. M.; Krukonis, V. J. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1985**, *11*, 393.
- (320) Randolph, T. W.; Blanch, H. W.; Prausnitz, J. M.; Wilke, C. R. *Biotechnol. Lett.* **1985**, *7*, 325.
- (321) Perrut, M. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2000**, *39*, 4531.
- (322) Blancard, L. A.; Hancu, D.; Beckman, E. J.; Brennecke, J. F. *Nature (London)* **1999**, *399*, 28.
- (323) Jarzebski, A. B.; Malinowski, J. J. *Process Biochem.* **1995**, *30*, 343.
- (324) Lozano, P.; de, D. T.; Carrie, D.; Vaultier, M.; Iborra, J. L. *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2002**, 692.
- (325) Hobbs, H. R.; Thomas, N. R. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 2786.
- (326) Jessop, P. g.; Leitner, W.; Editors *Chemical Synthesis Using Supercritical Fluids*; Wiley-VCH, **1999**.
- (327) Cantone, S.; Hanefeld, U.; Basso, A. *Green Chem.* **2007**, *9*, 954.
- (328) Mesiano, A. J.; Beckman, E. J.; Russell, A. J. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 623.
- (329) Rezaei, K.; Temelli, F.; Jenab, E. *Biotechnol. Adv.* **2007**, *25*, 272.
- (330) Cabri, W. *Catal. Today* **2009**, *140*, 2.
- (331) Matsuda, T.; Harada, T.; Nakamura, K. *Green Chem.* **2004**, *6*, 440.
- (332) Matsuda, T.; Kanamaru, R.; Watanabe, K.; Harada, T.; Nakamura, K. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 8319.
- (333) Matsuda, T.; Kanamaru, R.; Watanabe, K.; Kamitanaka, T.; Harada, T.; Nakamura, K. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 2087.
- (334) Garcia, S.; Lourenco, N. M. T.; Lousa, D.; Sequeira, A. F.; Mimoso, P.; Cabral, J. M. S.; Afonso, C. A. M.; Barreiros, S. *Green Chem.* **2004**, *6*, 466.
- (335) Sereti, V.; Stamatis, H.; Kolisis, F. N. *Biotechnol. Tech.* **1997**, *11*, 661.
- (336) Mori, T.; Okahata, Y. *Chem. Commun.* **1998**, 2215.
- (337) Mori, T.; Li, M.; Kobayashi, A.; Okahata, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1188.
- (338) Al-Duri, B.; Goddard, R.; Bosley, J. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, *11*, 825.
- (339) Gumi, T.; Paolucci-Jeanjean, D.; Belleville, M.-P.; Rios, G. M. *Desalination* **2006**, *200*, 505.

- (340) Lozano, P.; Diego, T.; Larnicol, M.; Vaultier, M.; Iborra, J. L. *Biotechnol. Lett.* **2006**, *28*, 1559.
- (341) Horvath, I. T.; Rabai, J. *Science* **1994**, *266*, 72.
- (342) Rabai, J.; In *Fun and games with fluororous chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: **2004**; pp 574-585.
- (343) Hobbs, H. R.; Kirke, H. M.; Poliakoff, M.; Thomas, N. R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 7860.
- (344) Reichardt, C. *Org. Process Res. Dev.* **2007**, *11*, 105.
- (345) Cornils, B.; Herrmann, W. A.; Horvath, I. T.; Leitner, W.; Mecking, S.; Olivier-Bourbigou, H.; Vogt, D.; Editors *Multiphase Homogeneous Catalysis, Volume 1*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2005**.
- (346) Cornils, B.; Herrmann, W. A.; Horvath, I. T.; Leitner, W.; Mecking, S.; Olivier-Bourbigou, H.; Vogt, D.; Editors *Multiphase Homogeneous Catalysis, Volume 2*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2005**.
- (347) Luo, Z.; Swaleh, S. M.; Theil, F.; Curran, D. P. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2585.
- (348) Dale, B. E. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2003**, *78*, 1093.
- (349) Danner, H.; Braun, R. *Chem. Soc. Rev.* **1999**, *28*, 395.
- (350) Garcia, J. A., Jornadas sobre Química verde y Producción limpia, **2005**.
- (351) Simeo, Y.; Sinisterra, J. V.; Alcantara, A. R. *Green Chem.* **2009**, *11*, 855.
- (352) Carmichael, A. J.; Seddon, K. R. *J. Phys. Org. Chem.* **2000**, *13*, 591.
- (353) El, S. O. A.; Koschella, A.; Fidale, L. C.; Dorn, S.; Heinze, T. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 2629.
- (354) MacFarlane, D. R.; Seddon, K. R. *Aust. J. Chem.* **2007**, *60*, 3.
- (355) Wells, A. S.; Coombe, V. T. *Org. Process Res. Dev.* **2006**, *10*, 794.
- (356) *Stability and Stabilization of Biocatalysts, Proceedings of an International Symposium organized under auspices of the Working Party on Applied Biocatalysis of the European Federation of Biotechnology, the University of Cordoba, Spain, and the Spanish Society of Biotechnology*; A. Ballesteros, F.J. Plou, J.L. Iborra and P.J. Halling ed., **1998**.
- (357) Kragl, U.; Eckstein, M.; Kaftzik, N. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 565.
- (358) Park, S.; Kazlauskas, R. J. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 432.
- (359) van, R. F.; Madeira, L. R.; Sheldon, R. A. *Trends Biotechnol.* **2003**, *21*, 131.
- (360) Yang, Z.; Pan, W. *Enzyme Microb. Technol.* **2005**, *37*, 19.
- (361) Zhao, H.; Malhotra, S. V. *Biotechnol. Lett.* **2002**, *24*, 1257.
- (362) Schofer, S. H.; Kaftzik, N.; Kragl, U.; Wasserscheid, P. *Chem. Commun.* **2001**, 425.
- (363) Persson, M.; Bornscheuer, U. T. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2003**, *22*, 21.
- (364) De, D. T.; Lozano, P.; Gmouh, S.; Vaultier, M.; Iborra, J. L. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 1457.
- (365) Itoh, T.; Akasaki, E.; Kudo, K.; Shirakami, S. *Chem. Lett.* **2001**, 262.
- (366) Ganske, F.; Bornscheuer, U. T. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 3097.
- (367) Gorke, J. T.; Okrasa, K.; Louwagie, A.; Kazlauskas, R. J.; Sreenc, F. *J. Biotechnol.* **2007**, *132*, 306.
- (368) Lou, W.-y.; Zong, M.-h.; Wu, H. *Biocatal. Biotransform.* **2004**, *22*, 171.
- (369) Zhao, H.; Jackson, L.; Song, Z.; Olubajo, O. *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 2491.
- (370) Kaftzik, N.; Wasserscheid, P.; Kragl, U. *Org. Process Res. Dev.* **2002**, *6*, 553.
- (371) Lang, M.; Kamrat, T.; Nidetzky, B. *Biotechnol. Bioeng.* **2006**, *95*, 1093.
- (372) Lutz-Wahl, S.; Trost, E. M.; Wagner, B.; Manns, A.; Fischer, L. *J. Biotechnol.* **2006**, *124*, 163.
- (373) Zhao, H. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2005**, *37*, 16.
- (374) Paulsen, H. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1982**, *21*, 155.
- (375) Svec, F.; Kalal, J.; Menyailova, I. I.; Nakhapetyan, L. A. *Biotechnol. Bioeng.* **1978**, *20*, 1319.
- (376) Drobnik, J.; Vlasak, J.; Pilar, J.; Svec, F.; Kalal, J. *Enzyme Microb. Technol.* **1979**, *1*, 107.
- (377) Kotha, A.; Raman, R. C.; Ponrathnam, S.; Shewale, J. G. *React. Funct. Polym.* **1996**, *28*, 227.

- (378) Kotha, A.; Raman, R. C.; Ponrathnam, S.; Kumar, K. K.; Shewale, J. G. *React. Funct. Polym.* **1996**, *28*, 235.
- (379) Kramer, D. M.; Lehmann, K.; Pennewiss, H.; Plainer, H. *Protides Biol. Fluids, Proc. Colloq.* **1976**, *23*, 505.
- (380) Jovanovic, S. M.; Nastasovic, A.; Jovanovic, N. N.; Jeremic, K. *Mater. Sci. Forum* **1996**, *214*, 155.
- (381) Rajan, C. R. M., K.S.; Bahulkar, R.V.; Ponrathnam, S. IN184871, **2001**.
- (382) Prodanovic, R.; Milosavic, N.; Jovanovic, S.; Prodanovic, O.; Cirkovic, V. T.; Vujcic, Z.; Jankov, R. M. *Biocatal. Biotransform.* **2006**, *24*, 195.
- (383) Bhushan, I.; Parshad, R.; Qazi, G. N.; Ingavle, G.; Rajan, C. R.; Ponrathnam, S.; Gupta, V. K. *Process Biochem.* **2008**, *43*, 321.
- (384) Chen, B.; Hu, J.; Miller, E. M.; Xie, W.; Cai, M.; Gross, R. A. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 463.
- (385) Vaidya, B. K.; Ingavle, G. C.; Ponrathnam, S.; Kulkarni, B. D.; Nene, S. N. *Bioresour. Technol.* **2008**, *99*, 3623.
- (386) Abd, E.-G. M. A.; Atia, K. S.; Hashem, M. S. *J. Appl. Polym. Sci.* **2010**, *117*, 629.
- (387) Bai, Y.; Li, Y.; Lei, L. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *83*, 457.
- (388) Mateo, C.; Fernandez-Lorente, G.; Abian, O.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J. M. *Biomacromolecules* **2000**, *1*, 739.
- (389) Mateo, C.; Torres, R.; Fernandez-Lorente, G.; Ortiz, C.; Fuentes, M.; Hidalgo, A.; Lopez-Gallego, F.; Abian, O.; Palomo, J. M.; Betancor, L.; Pessela, B. C. C.; Guisan, J. M.; Fernandez-Lafuente, R. *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 772.
- (390) Grazu, V.; Abian, O.; Mateo, C.; Batista-Viera, F.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J. M. *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 1495.
- (391) Torres, R.; Mateo, C.; Fernandez-Lorente, G.; Ortiz, C.; Fuentes, M.; Palomo, J. M.; Guisan, J. M.; Fernandez-Lafuente, R. *Biotechnol. Prog.* **2003**, *19*, 1056.
- (392) Knezevic-Jugovic, Z. D.; Bezbradica, D. I.; Mijin, D. Z.; Antov, M. G. *Methods Mol. Biol.* **2011**, *679*, 99.
- (393) Miletic, N.; Rohandi, R.; Vukovic, Z.; Nastasovic, A.; Loos, K. *React. Funct. Polym.* **2009**, *69*, 68.
- (394) Anthonson, T.; Jongejan, J. A. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2003**, *21*, 1.
- (395) Overbeeke, P. L. A.; Govardhan, C.; Khalaf, N.; Jongejan, J. A.; Heijnen, J. J. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2000**, *10*, 385.
- (396) Garcia-Urdiales, E.; Rebollo, F.; Gotor, V. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 3047.
- (397) Fernandez-Lorente, G.; Terreni, M.; Mateo, C.; Bastida, A.; Fernandez-Lafuente, R.; Dalmases, P.; Huguet, J.; Guisan, J. M. *Enzyme Microb. Technol.* **2001**, *28*, 389.
- (398) Palomo, J. M.; Fernandez-Lorente, G.; Mateo, C.; Fuentes, M.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J. M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 1337.
- (399) Bar-Eli, A.; Katchalski, E. *Nature (London, U. K.)* **1960**, *188*, 856.
- (400) Silman, I. H.; Katchalski, E. *Annu. Rev. Biochem.* **1966**, *35*, 873.
- (401) Tosa, T.; Mori, T.; Fuse, N.; Chibata, I. *Biotechnol. Bioeng.* **1967**, *9*, 603.
- (402) Bayramoglu, G.; Yilmaz, M.; Arica, M. Y. *Food Chemistry* **2004**, *84*, 591.
- (403) Akgol, S.; Bayramoglu, G.; Kacar, Y.; Denizli, A.; Arica, M. Y. *Polym. Int.* **2002**, *51*, 1316.
- (404) Pasta, P.; Verga, R.; Zambianchi, F.; Daminati, M. *Biocatal. Biotransform.* **2004**, *22*, 221.
- (405) Anthonson, T.; D'Arrigo, P.; Pedrocchi-Fantoni, G.; Secundo, F.; Servi, S.; Sundby, E. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1999**, *6*, 125.
- (406) de, S. A. G.; Alcalde, M.; Yates, M.; Rojas-Cervantes, M. L.; Lopez-Cortes, N.; Ballesteros, A.; Plou, F. J. *Biotechnol. Prog.* **2004**, *20*, 1414.
- (407) Keller, R.; Schlingmann, M.; Woernle, R. *Methods Enzymol.* **1987**, *136*, 517.
- (408) Seip, J. E.; Fager, S. K.; Gavagan, J. E.; Anton, D. L.; Di, C. R. *Bioorg. Med. Chem.* **1994**, *2*, 371.
- (409) Danisman, T.; Tan, S.; Kacar, Y.; Ergene, A. *Food Chem.* **2003**, *85*, 461.
- (410) Saudagar, P. S.; Singhal, R. S. *Carbohydr. Polym.* **2004**, *56*, 483.

- (411) Ragnitz, K.; Pietzsch, M.; Syldatk, C. *J. Biotechnol.* **2001**, *92*, 179.
- (412) Zuffi, G.; Ghisotti, D.; Oliva, I.; Capra, E.; Frascotti, G.; Tonon, G.; Orsini, G. *Biocatal. Biotransform.* **2004**, *22*, 25.
- (413) Hublik, G.; Schinner, F. *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, *27*, 330.
- (414) Martin, M. T.; Plou, F. J.; Alcalde, M.; Ballesteros, A. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2003**, *21*, 299.
- (415) Pessela, B. C. C.; Mateo, C.; Fuentes, M.; Vian, A.; Garcia, J. L.; Carrascosa, A. V.; Guisan, J. M.; Fernandez-Lafuente, R. *Biotechnol. Prog.* **2004**, *20*, 388.
- (416) Solomon, B.; Hadas, E.; Koppel, R.; Schwartz, F.; Fleminger, G. *Journal of Chromatography A* **1991**, *539*, 335.
- (417) Mateo, C.; Grazu, V.; Palomo, J. M.; Lopez-Gallego, F.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J. M. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 1022.
- (418) Pérez-Sánchez, M.; Cortés Cabrera, Á.; García-Martín, H.; Sinisterra, J. V.; García, J. I.; Hernáiz, M. J. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 7708.
- (419) Suzuki, K.; Fujimoto, H.; Ito, Y.; Sasaki, T.; Ajisaka, K. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 1211.
- (420) Fujimoto, H.; Miyasato, M.; Ito, Y.; Sasaki, T.; Ajisaka, K. *Glycoconjugate J.* **1998**, *15*, 155.
- (421) Ajisaka, K.; Miyasato, M. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2000**, *64*, 1743.
- (422) Ajisaka, K.; Miyasato, M.; Ito, C.; Fujita, Y.; Yamazaki, Y.; Oka, S. *Glycoconjugate J.* **2002**, *18*, 301.
- (423) Suzuki, K.; Matsuo, I.; Isomura, M.; Ajisaka, K. *J. Carbohydr. Chem.* **2002**, *21*, 99.
- (424) Yamamoto, Y.; Saito, T.; Ajisaka, K. *J. Appl. Glycosci.* **2004**, *51*, 335.
- (425) Kroeger, L.; Thiem, J. *J. Carbohydr. Chem.* **2005**, *24*, 717.
- (426) Naundorf, A.; Caussette, M.; Ajisaka, K. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **1998**, *62*, 1313.
- (427) Sandoval, M.; Ferreras, E.; Perez-Sanchez, M.; Berenguer, J.; Sinisterra, J. V.; Hernaiz, M. J. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2012**, *74*, 162.
- (428) Tongboriboon, K.; Cheirsilp, B.; H-Kittikun, A. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *67*, 52.
- (429) Iso, M.; Chen, B.; Eguchi, M.; Kudo, T.; Shrestha, S. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, *16*, 53.
- (430) Machsun, A. L.; Gozan, M.; Nasikin, M.; Setyahadi, S.; Yoo, Y. *J. Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2010**, *15*, 911.
- (431) Kapustin, D. V.; Vikhrov, A. A.; Gorokhova, I. V.; Generalova, A. N.; Kalyazina, O. V.; Murzabekova, T. G.; Zubov, V. P. *Russ. Chem. Bull.* **2005**, *54*, 452.
- (432) Santos, J. C.; Paula, A. V.; Nunes, G. F. M.; de, C. H. F. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, *52-53*, 49.
- (433) Salis, A.; Bhattacharyya, M. S.; Monduzzi, M.; Solinas, V. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, *57*, 262.
- (434) Rufino, A. R.; Biaggio, F. C.; Santos, J. C.; de, C. H. F. *Int. J. Biol. Macromol.* **2010**, *47*, 5.
- (435) Zarcula, C.; Corici, L.; Croitoru, R.; Ursoiu, A.; Peter, F. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *65*, 79.
- (436) Tomin, A.; Weiser, D.; Hellner, G.; Bata, Z.; Corici, L.; Peter, F.; Koczka, B.; Poppe, L. *Process Biochem.* **2011**, *46*, 52.
- (437) Ji, P.; Tan, H.; Xu, X.; Feng, W. *AIChE J.* **2010**, *56*, 3005.
- (438) Hoffmann, I.; Silva, V. D.; Nascimento, M. d. G. *J. Braz. Chem. Soc.* **2011**, *22*, 1559.
- (439) Quirós, M.; García, A. B.; Montes-Morán, M. A. *Carbon* **2011**, *49*, 406.
- (440) Truppo, M. D.; Hughes, G. *Org. Process Res. Dev.* **2011**, *15*, 1033.
- (441) Kramer, M.; Cruz, J. C.; Pfromm, P. H.; Rezac, M. E.; Czermak, P. *J. Biotechnol.* **2010**, *150*, 80.
- (442) Jung, S.; Kim, Y.; Kim, S.-J.; Kwon, T.-H.; Huh, S.; Park, S. *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2011**, *47*, 2904.
- (443) Zhou, H.; Chen, J.; Ye, L.; Lin, H.; Yuan, Y. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 5562.
- (444) Wang, B.; Jiang, L.; Wang, J.; Ma, J.; Liu, M.; Yu, H. *Tetrahedron: Asymmetry* **2011**, *22*, 980.

- (445) Hara, P.; Mikkola, J.-P.; Murzin, D. Y.; Kanerva, L. T. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *67*, 129.
- (446) Chen, Y.-Z.; Ching, C.-B.; Xu, R. *Process Biochem.* **2009**, *44*, 1245.
- (447) Rebelo, L. P.; Netto, C. G. C. M.; Toma, H. E.; Andrade, L. H. *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21*, 1537.
- (448) Shah, S.; Gupta, M. N. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 921.
- (449) Kirilin, A.; Sahin, S.; Tokarev, A.; Maeki-Arvela, P.; Kordas, K.; Leino, A. R.; Shchukarev, A.; Mikkola, J. P.; Kustov, L. M.; Salmi, T.; Murzin, D. Y. *Kinet. Catal.* **2010**, *51*, 809.
- (450) Wuyts, S.; De, T. K.; De, V. D.; Jacobs, P. *Chem. Commun.* **2003**, 1928.
- (451) Wuyts, S.; De, T. K.; De, V. D. E.; Jacobs, P. A. *Chem.--Eur. J.* **2005**, *11*, 386.
- (452) Zhu, Y.; Fow, K.-L.; Chuah, G.-K.; Jaenicke, S. *Chem.--Eur. J.* **2007**, *13*, 541.
- (453) Wuyts, S.; Wahlen, J.; Jacobs, P. A.; De, V. D. E. *Green Chem.* **2007**, *9*, 1104.
- (454) Benaissi, K.; Poliakoff, M.; Thomas, N. R. *Green Chemistry* **2009**, *11*, 617.
- (455) Lozano, P.; De, D. T.; Mira, C.; Montague, K.; Vaultier, M.; Iborra, J. L. *Green Chem.* **2009**, *11*, 538.
- (456) Mavrynsky, D.; Kanerva, L. T.; Sillanpaa, R.; Leino, R. *Pure Appl. Chem.* **2011**, *83*, 479.
- (457) Lozano, P.; Garcia-Verdugo, E.; Karbass, N.; Montague, K.; De, D. T.; Burguete, M. I.; Luis, S. V. *Green Chem.* **2010**, *12*, 1803.
- (458) van, N. S. F. G. M.; van, B. J.; Vekemans, J. A. J. M.; Meuldijk, J.; Hulshof, L. A. *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 2299.
- (459) Verzijl, G. K. M.; de, V. J. G.; Broxterman, Q. B. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 1603.
- (460) Soyer, A.; Bayraktar, E.; Mehmetoglu, U. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **2010**, *40*, 389.
- (461) Bachu, P.; Gibson, J. S.; Sperry, J.; Brimble, M. A. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 1618.
- (462) Nagaoka, H.; Kayahara, H.; Wakabayashi, Y. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2001**, *65*, 634.
- (463) Koszelewski, D.; Redzej, A.; Ostaszewski, R. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2007**, *47*, 51.
- (464) Domingo, J. W. S.; Radway, J. C.; Wilde, E. W.; Hermann, P.; Hazen, T. C. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **1997**, *18*, 389.
- (465) Yadav, G. D.; Jadhav, S. R. *Microporous Mesoporous Mater.* **2005**, *86*, 215.
- (466) Pencreac'h, G.; Leullier, M.; Baratti, J. C. *Biotechnol. Bioeng.* **1997**, *56*, 181.
- (467) Nouredini, H.; Gao, X.; Philkana, R. S. *Bioresour. Technol.* **2005**, *96*, 769.
- (468) Zheng, L.; Zhang, S.; Zhao, L.; Zhu, G.; Yang, X.; Gao, G.; Cao, S. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, *38*, 119.
- (469) Chang, Q.-L.; Lee, C.-H.; Parkin, K. L. *Enzyme Microb. Technol.* **1999**, *25*, 290.
- (470) Shah, S.; Gupta, M. N. *Process Biochem.* **2007**, *42*, 409.
- (471) Salis, A.; Pinna, M.; Monduzzi, M.; Solinas, V. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, *54*, 19.
- (472) Debeche, T.; Marmet, C.; Kiwi-Minsker, L.; Renken, A.; Juillerat, M.-A. *Enzyme Microb. Technol.* **2005**, *36*, 911.
- (473) Sakai, S.; Liu, Y.; Yamaguchi, T.; Watanabe, R.; Kawabe, M.; Kawakami, K. *Biotechnol. Lett.* **2010**, *32*, 1059.
- (474) Hoyos, P.; Buthe, A.; Ansoorge-Schumacher, M. B.; Sinisterra, J. V.; Alcantara, A. R. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, *52-53*, 133.
- (475) Fauré, N.; Illanes, A. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2011**, *165*, 1332.
- (476) Hoyos, P., Universidad Complutense de Madrid, **2008**.
- (477) Hoyos, P.; Fernandez, M.; Sinisterra, J. V.; Alcantara, A. R. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7632.
- (478) Hoyos, P.; Quezada, M. A.; Sinisterra, J. V.; Alcantara, A. R. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2011**, *72*, 20.
- (479) Hoyos, P.; Pace, V.; Sinisterra, J. V.; Alcantara, A. R. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 7321.
- (480) Baldwin, J. J.; Raab, A. W.; Mensler, K.; Arison, B. H.; McClure, D. E. *The Journal of Organic Chemistry* **1978**, *43*, 4876.

- (481) Getmanova, E. V.; Tereshchenko, A. S.; Ignateva, G. M.; Tatarinova, E. A.; Myakushev, V. D.; Muzafarov, A. M. *Russ. Chem. Bull.* **2004**, *53*, 137.
- (482) Emrick, T.; Chang, H.-T.; Frechet, J. M. J. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2000**, *38*, 4850.
- (483) Ito, K.; Furukawa, S.; Kobayashi, G.; Kureha Chemical Industry Co., Epoxides. JP38019104B4, **1963**.
- (484) Herault, D.; Saluzzo, C.; Lemaire, M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 1944.
- (485) Zemplen, G.; Bruckner, Z.; Gerecs, A. *Ber. Dtsch. Chem. Ges. B* **1929**, *62B*, 985.
- (486) Garrido Espinosa F.; Ibáñez Paniello, A. *Anales de Química* **1981**, *77*, 22.
- (487) Niwa, M.; Hayashi, T.; Matsumoto, T. *J. Macromol. Sci., Chem.* **1986**, *A23*, 433.
- (488) Yuan, H. G.; Kalfas, G.; Ray, W. H. *J. Macromol. Sci., Rev. Macromol. Chem. Phys.* **1991**, *C31*, 215.
- (489) Dowding, P. J.; Vincent, B. *Colloids Surf., A* **2000**, *161*, 259.
- (490) Viklund, C.; Svec, F.; Frechet, J. M. J.; Irgum, K. *Chem. Mater.* **1996**, *8*, 744.
- (491) Takahashi, H.; Li, B.; Sasaki, T.; Miyazaki, C.; Kajino, T.; Inagaki, S. *Chem. Mater.* **2000**, *12*, 3301.
- (492) Gupta, M. N. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1991**, *14*, 1.
- (493) Bes, M. T.; Gomez-Moreno, C.; Guisan, J. M.; Fernandez-Lafuente, R. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **1995**, *98*, 161.
- (494) Fernandez-Lafuente, R.; Rodriguez, V.; Guisan, J. M. *Enzyme Microb. Technol.* **1998**, *23*, 28.
- (495) Kim, J.; Grate, J. W.; Wang, P. *Chemical Engineering Science* **2006**, *61*, 1017.
- (496) Okay, O. *Prog. Polym. Sci.* **2000**, *25*, 711.
- (497) Santora, B. P.; Gagné, M. R.; Moloy, K. G.; Radu, N. S. *Macromolecules* **2001**, *34*, 658.
- (498) Scheler, S. *Journal of Applied Polymer Science* **2007**, *105*, 3121.
- (499) Alma, M. H.; Hafizoglu, H.; Maldas, D. *Int. J. Polym. Mater.* **1996**, *32*, 93.
- (500) Yu, Y.; Sun, Y. *J. Chromatogr., A* **1999**, *855*, 129.
- (501) Sciannamea, V.; Catala, J.-M.; Jérôme, R.; Detrembleur, C. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2007**, *45*, 1219.
- (502) Svec, F.; Frechet, J. M. J. *Macromolecules* **1995**, *28*, 7580.
- (503) Beck, J. S.; Vartuli, J. C.; Roth, W. J.; Leonowicz, M. E.; Kresge, C. T.; Schmitt, K. D.; Chu, C. T. W.; Olson, D. H.; Sheppard, E. W.; et, a. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10834.
- (504) Kresge, C. T.; Leonowicz, M. E.; Roth, W. J.; Vartuli, J. C.; Beck, J. S. *Nature* **1992**, *359*, 710.
- (505) Xia, Y.; Mokaya, R. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 3889.
- (506) Brunauer, S.; Emmett, P. H.; Teller, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1938**, *60*, 309.
- (507) Webb, P. A. *Analytical Methods in Fine Particle Technology*; Micromeritics Instrument Corporation: USA, **1997**.
- (508) Barrett, E. P.; Joyner, L. G.; Halenda, P. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 373.
- (509) Mujawar, S. K.; Dutta, D.; Nanda, R. K.; Hindustan Antibiotics Ltd., IN2002MU00590A, **2004**.
- (510) Bhushan, I.; Parshad, R.; Qazi, G. N.; Ingavle, G.; Jamalpure, T. M.; Rajan, C. R.; Ponrathnam, S.; Gupta, V. K. *J. Bioact. Compat. Polym.* **2007**, *22*, 174.
- (511) Vaidya, B. K.; Karale, A. J.; Suthar, H. K.; Ingavle, G.; Pathak, T. S.; Ponrathnam, S.; Nene, S. *React. Funct. Polym.* **2007**, *67*, 905.
- (512) Thudi, L.; Jasti, L. S.; Swarnalatha, Y.; Fadnavis, N. W.; Mulani, K.; Deokar, S.; Ponrathnam, S. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2012**, *74*, 54.
- (513) Smigol, V.; Svec, F. *J. Appl. Polym. Sci.* **1993**, *48*, 2033.
- (514) Sherrington, D. C. *Chem. Commun. (Cambridge)* **1998**, 2275.
- (515) Danquah, M. K.; Ho, J.; Forde, G. M. *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 2843.
- (516) Miletić, N.; Vuković, Z.; Nastasović, A.; Loos, K. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2009**, *56*, 196.
- (517) Jontell, M.; Hanks, C. T.; Bratel, J.; Bergenholtz, G. *J. Dent. Res.* **1995**, *74*, 1162.
- (518) Novick, S. J.; Dordick, J. S. *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *68*, 665.

- (519) Komkova, E. N.; Mika, A. M.; Pankratz, M.; Natrix Separations, WO2011058439A1, **2011**.
- (520) Bayramoglu, G.; Kaya, B.; Yakup, A. M. *Food Chem.* **2005**, *92*, 261.
- (521) Bayramoglu, G.; Yakup, A. M. *Mater. Sci. Eng., C* **2009**, *29*, 1990.
- (522) Arica, M. Y.; Kacar, Y.; Ergene, A.; Denizli, A. *Process Biochem. (Oxford, U. K.)* **2001**, *36*, 847.
- (523) Arica, M. Y.; Yavuz, H.; Denizli, A. *J. Appl. Polym. Sci.* **2001**, *81*, 2702.
- (524) Podual, K.; Doyle, F. J.; Peppas, N. A. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2000**, *67*, 9.
- (525) Ganguli, S.; Yoshimoto, K.; Tomita, S.; Sakuma, H.; Matsuoka, T.; Shiraki, K.; Nagasaki, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6549.
- (526) Ganguli, S.; Yoshimoto, K.; Tomita, S.; Sakuma, H.; Matsuoka, T.; Shiraki, K.; Nagasaki, Y. *Macromol. Biosci.* **2010**, *10*, 853.
- (527) Ericsson, J.; Lindquist, C.; Pharmacia Biotech AB, Swed.; Ericsson, Jan; WO9731026A1, **1997**.
- (528) Hong, S. E.; Chung, M. H.; Kim, H. S.; Chung, J. C.; Paek, K. H.; Hyundai Electronics Industries Co., Ltd., JP2001083696A . **2001**.
- (529) Krueger, H.; Thesen, M.; Janietz, S.; Wedel, A.; Fraunhofer-Gesellschaft zur Foerderung der Angewandten Forschung e.V., WO2009040000A1, **2009**.
- (530) Janietz, S.; Schulze, K.; Egorov-Brening, T.; Von, S. H.; Katholing, E.; Angewandten Forschung e.V., WO2012022390A1, **2012**.
- (531) Siles, F. J. M., Universidad Complutense de Madrid, **2005**.
- (532) de Segura, A. G.; Alcalde, M.; Yates, M.; Rojas-Cervantes, M. L.; López-Cortés, N.; Ballesteros, A.; Plou, F. J. *Biotechnology Progress* **2004**, *20*, 1414.
- (533) Antonio Aires, A. T., Héctor García-Marín, Jorge Trelles, José I. García, Juan Hermoso, Angel Rumbero, and María J. Hernáiz *Green Chem.* **xxx**, *xxx*, *xxx*.
- (534) Perez, M., Universidad Complutense de Madrid, 2010.
- (535) Boyer, P. D. *The Enzymes: Elimination and addition aldol cleavage and condensation other C-C cleavage ; Phosphorolysis ; Hydrolysis*; Academic Press, **1972**.
- (536) Craven, G. R.; Steers, E., Jr.; Anfinsen, C. B. *J. Biol. Chem.* **1965**, *240*, 2468.
- (537) Zeng, X.; Yoshino, R.; Murata, T.; Ajisaka, K.; Usui, T. *Carbohydr. Res.* **2000**, *325*, 120.
- (538) Perez-Sanchez, M.; Sandoval, M.; Cortes-Cabrera, A.; Garcia-Marin, H.; Sinisterra, J. V.; Garcia, J. I.; Hernaiz, M. J. *Green Chem.* **2011**, *13*, 2810.
- (539) Perez-Sanchez, M.; Sandoval, M.; Hernaiz, M. J. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 2141.
- (540) Garcia, J. I.; Garcia-Marin, H.; Mayoral, J. A.; Perez, P. *Green Chem.* **2010**, *12*, 426.
- (541) Husum, T. L.; Jorgensen, C. T.; Christensen, M. W.; Kirk, O. *Biocatal. Biotransform.* **2001**, *19*, 331.
- (542) Kragl, U.; Kaftzik, N.; Schofer, S. H.; Eckstein, M.; Wasserscheid, P.; Hilgers, C. *Chim. Oggi* **2001**, *19*, 22.
- (543) Singh, N. R.; Narinesingh, D.; Singh, G. *J. Mol. Liq.* **2010**, *152*, 19.
- (544) Ferdjani, S.; Ionita, M.; Roy, B.; Dion, M.; Djeghaba, Z.; Rabiller, C.; Tellier, C. *Biotechnol Lett* **2011**, *33*, 1215.
- (545) Kiss, V.; Egri, G.; Balint, J.; Ling, I.; Barkoczi, J.; Fogassy, E. *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 2220.
- (546) Banoth, L.; Singh, M.; Tekewe, A.; Banerjee, U. C. *Biocatal. Biotransform.* **2009**, *27*, 263.
- (547) Habulin, M.; Knez, Z. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, *58*, 24.
- (548) Pilissao, C.; Carvalho, P. d. O.; Nascimento, M. d. G. *Process Biochem. (Amsterdam, Neth.)* **2009**, *44*, 1352.
- (549) Pilissao, C.; Carvalho, P. d. O.; Nascimento, M. d. G. *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21*, 973.
- (550) Palomo, J. M.; Muñoz, G.; Fernández-Lorente, G.; Mateo, C.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J. M. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2002**, *19–20*, 279.

- (551) Álvaro, G., & Illanes, A. In *Enzyme biocatalysis: principles and applications*; Illanes, A., Ed.; UK: Springer.: **2008**, p 292.
- (552) Palomo, J. M.; Segura, R. L.; Fernández-Lorente, G.; Pernas, M.; Rua, M. L.; Guisán, J. M.; Fernández-Lafuente, R. *Biotechnology Progress* **2004**, *20*, 630.
- (553) Bastida, A.; Sabuquillo, P.; Armisen, P.; Fernández-Lafuente, R.; Huguet, J.; Guisán, J. M. *Biotechnology and Bioengineering* **1998**, *58*, 486.
- (554) Holmberg, E.; Hult, K. *Biocatalysis* **1990**, *3*, 243.
- (555) Kitaguchi, H.; Itoh, I.; Ono, M. *Chem. Lett.* **1990**, 1203.
- (556) Servi, S.; Editor *Microbial Reagents in Organic Synthesis. (Proceedings of the NATO Advanced Research Workshop on Microbial Reagents in Organic Synthesis, Sestri Levante, Italy, March 23-27, 1992.)* [In: *NATO ASI Ser., Ser. C, 1992; 381*]; Kluwer, 1992.
- (557) Hoegberg, H. E.; Edlund, H.; Berglund, P.; Hedenstrom, E. *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4*, 2123.
- (558) Edlund, H.; Berglund, P.; Jensen, M.; Hendenstroem, E.; Hoegberg, H. E. *Acta Chem. Scand.* **1996**, *50*, 666.
- (559) Yasufuku, Y.; Ueji, S.-I. *Bioorg. Chem.* **1997**, *25*, 88.
- (560) Csajagi, C.; Szatzker, G.; Rita, T. E.; Uerge, L.; Darvas, F.; Poppe, L. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 237.
- (561) Morgan, B.; Oehlschlager, A. C.; Stokes, T. M. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 3231.
- (562) Miyazawa, T.; Houhashi, M.; Inoue, Y.; Murashima, T.; Yamada, T. *Biotechnol. Lett.* **2008**, *30*, 1783.
- (563) Theisen, P. D.; Heathcock, C. H. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 2374.
- (564) Bouzemi, N.; Aribi-Zouioueche, L.; Fiaud, J.-C. *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 797.
- (565) Bakker, M.; Spruijt, A. S.; Van, R. F.; Sheldon, R. A. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 1801.
- (566) Suginaka, K.; Yahashi, Y.; Yamamoto, Y. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 1153.
- (567) Debbeche, H.; Toffano, M.; Fiaud, J.-C.; Aribi-Zouioueche, L. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *66*, 319.
- (568) Ball, A. J.; Corr, S.; Micklefield, J. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 3543.
- (569) Kim, J.; Lee, S. W.; Jun, S.-H.; Jang, M.-S.; Kim, B. C.; Packing of enzyme immobilized polymers in columns. WO2011105820A2, 2011.2011, p 38pp.
- (570) Quirk, R. P.; Zhuo, Q. *Macromolecules* **1997**, *30*, 1531.
- (571) Chen, B.; Hu, J.; Miller, E. M.; Xie, W.; Cai, M.; Gross, R. A. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 463.
- (572) Fazio, P. C., et al., *Annual Book of ASTM Standards*; American Society for Testing and Materials: Philadelphia, PA ed.; American Society for Testing and Materials: Philadelphia, PA.; Philadelphia, PA **1993**; Vol. 0801.
- (573) Bradford, M. M. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248.
- (574) Bridiau, N.; Maugard, T. *Biotechnol. Prog.* **2011**, *27*, 386.